

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

**PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES DE LAS
FAMILIAS OATP Y ABC EN LA VÍA DE EXCRECIÓN
DE ANIONES ORGÁNICOS COLEFÍLICOS FETALES
CONSTITUIDA POR EL BINOMIO PLACENTA-HÍGADO
MATERNO**

TESIS DOCTORAL

Alba M^a García Blázquez

2009

FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

**PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES DE LAS
FAMILIAS OATP Y ABC EN LA VÍA DE EXCRECIÓN
DE ANIONES ORGÁNICOS COLEFÍLICOS FETALES
CONSTITUIDA POR EL BINOMIO PLACENTA-HÍGADO
MATERNO**

Memoria que presenta **Dña. Alba M^a García Blázquez** para optar al
Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 7 de septiembre de 2009

UNIVERSITY OF SALAMANCA
DEPARTAMENT OF PHYSIOLOGY
AND PHARMACOLOGY
DOCTORAL THESIS (SUMMARY)



**ROLE OF OATP AND ABC TRANSPORTERS ON THE
PLACENTA-MATERNAL LIVER TANDEM EXCRETORY
PATHWAY FOR FETAL CHOLEPHILIC ORGANIC ANIONS**

Alba M^a Garcia Blázquez

Supervised by:

Dr. Jose J. G. Marin, Dpt. Physiology and Pharmacology

Dr. Rocio I.R. Macias, Dpt. Physiology and Pharmacology

Dr. Oscar Briz, Research Unit, University Hospital of Salamanca

Salamanca, 13th August 2009

- Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

MA Serrano, RIR Macias, O Briz, MJ Monte, AG Blazquez, C Williamson, R Kubitz and JJG Marin. 2007. Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta*. 28: 107-117.

O Briz, D Cassio, AG Blazquez, B Grosse, MA Serrano and JJG Marin. 2007. Characterization of WIF-B9/R cells as an in vitro model with hepatocyte-like polarity and enhanced expression of canalicular ABC transporters involved in phase III of hepatic detoxification. *Toxicology*. 232: 24-36.

M Perez, AG Blazquez, R Real, G Mendoza, JG Prieto, G Merino, AI Alvarez. 2009. In vitro and in vivo interaction of moxidectin with BCRP/ABCG2. *Chemico-Biological Interaction*. 180: 106-112.

- En forma de abstracts en las siguientes revistas:

AG Blazquez, O Briz, MA Serrano, D Cassio, B Grosse, JJG Marin. 2007. Papel de la proteína BCRP/ABCG2 en la fisiología hepatobiliar como bomba canalicular exportadora de derivados de ácidos biliares. *Gastroenterología y Hepatología*. 30 (Supl 1): 148.

AG Blazquez, O Briz, MA Serrano, JJG Marin. Papel de la proteína BCRP/ABCG2 en el transporte canalicular de derivados de ácidos biliares. 2007. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 99 (Supl 1): 78-79.

AG Blazquez, O Briz, MA Serrano, JJG Marin. Role of human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the canalicular transport of bile acid derivatives. 2007. *Acta Physiologica*. 190 (Supl 655): 105.

AG Blazquez, O Briz, M Romero, R Rosales, MJ Perez, E. Herraiz, C. Ghanem, F. Jimenez, JJG Marín. Transporte de ácidos biliares sulfatados y sensibilidad a esteroides colestáticos de la bomba ABCG2 canalicular. 2008. *Gastroenterología y Hepatología*. 31 (Supl 1): 118-119.

AG Blazquez, O Briz, MR Romero, R Rosales, P Martinez-Becerra, F Jimenez, MA Serrano, JJG Marin. Evidences for a role of canalicular BCRP/ABCG2 on sulphated bile acid secretion. 2008. *Journal of Hepatology*. 48 (Supl 2): 56-57.

- Han sido presentados en los siguientes congresos:

Congreso: XXX de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Elche (2006).

Autores: MR Romero, O Briz, AG Blázquez, MA Serrano, JJG Marin.

Título: Papel de la proteína BCRP/ABCG2 en el transporte canalicular de derivados de ácidos biliares.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XIX International Bile Acid Meeting. Bile Acids: Biological Actions and Clinical Relevance. Freiburg (Alemania), (2006).

Autores: AG Blazquez, O Briz, D Cassio, B Grosse, M Del Rio, S Cuesta De Juan, MA Serrano, JJG Marin.

Título: Role of human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the canalicular transport of bile acid derivatives

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XX Internacional Bile Acid Meeting. Bile Acid Biology and Therapeutic Actions. Amsterdam (Holanda), (2008).

Autores: AG Blazquez, O Briz, MR Romero, R Rosales, P Martinez-Becerra, C Ghanem, MA Serrano, JJG Marin

Título: Transport of sulphated bile acids by canalicular ABCG2

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Bilbao (2008).

Autores: AG Blazquez, O Briz, MR Romero, R Rosales, MJ Perez, JJG Marin

Título: Papel de la bomba exportadora ABCG2 en la secreción canalicular de ácidos biliares sulfatados

Tipo de participación: Póster

JOSE JUAN GARCÍA MARÍN CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, ROCÍO ISABEL RODRÍGUEZ MACÍAS TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y OSCAR BRIZ SÁNCHEZ CONTRATADO INVESTIGADOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES DE LAS FAMILIAS OATP Y ABC EN LA VÍA DE EXCRECIÓN DE ANIONES ORGÁNICOS COLEFÍLICOS FETALES CONSTITUIDA POR EL BINOMIO PLACENTA-HÍGADO MATERNO" presentada por Dña. Alba Mª García Blázquez para optar al Título de Doctor de la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a día 7 de septiembre de 2009.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. Rocío Isabel Rodríguez Macías

Fdo. Oscar Briz Sánchez

RAFAEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada " PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES DE LAS FAMILIAS OATP Y ABC EN LA VÍA DE EXCRECIÓN DE ANIONES ORGÁNICOS COLEFÍLICOS FETALES CONSTITUIDA POR EL BINOMIO PLACENTA-HÍGADO MATERNO" presentada por Dña. Alba M^a García Blázquez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los Drs. D. José Juan García Marín y Dña. Rocío Isabel Rodríguez Macías del Departamento de Fisiología y Farmacología, y el Dr. D. Oscar Briz Sánchez de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 7 de septiembre de 2009.

Fdo. Rafael Jiménez Fernández

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia y de un contrato para la realización de Proyectos de Investigación del Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)-Universidad de Salamanca.

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III) y a los siguientes Proyectos:

Dirección General de Investigación (Plan I+D+I) y fondos FEDER. Proyecto BFI2003-03208. "Papel de los cambios de expresión de transportadores OATP y ABC en la modulación de la vía de excreción de aniones orgánicos colefilicos fetales constituida por el binomio placenta-hígado materno". Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2004-2006.

Ministerio de Educación y Ciencia. Proyectos FU2005-24983-E/BFI y BFU2007-30688-E/BFI "Red española de investigación sobre proteínas transportadoras de membrana y sus implicaciones fisiológicas, patológicas y farmacológicas (REIT)". Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2006-2008 y 2008-2009.

Ministerio de Ciencia e Innovación. Proyecto BFU2006-12577/BFI. "Papel de transportadores de membrana de las familias OATP y ABC en los mecanismos hepáticos de defensa frente a la toxicidad de sustancias endógenas y xenobióticas". Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2007-2009.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA035A08. "Mecanismos transcripcionales que modulan la aparición del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, mediados por el gen ABCC2, en células tumorales hepáticas". Investigador Principal: M^a Ángeles Serrano García. Periodo: 2008-2009.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto GR75/2008. "Resistencia a la terapia farmacológica en el tratamiento del cáncer hepático y digestivo. Investigación de los mecanismos implicados y desarrollo de un método predictivo". Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2008-2010.

Dirección General Investigación, MEC, BFU2005-24983-E/BFI y BFU2007-30688-E/BFI. "Red Española de Investigación sobre proteínas Transportadoras de membrana y sus implicaciones fisiológicas, fisiopatológicas y farmacológicas" (REIT). Investigador principal: José Juan García Marín. Periodo: 2005-2008.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. SAN673SA07/08. "Puesta a punto de un método diagnóstico para la detección precoz de colangiocarcinoma en grupos de riesgo". Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2008.

Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León SA033A08. "Investigación de la expresión y función del receptor de membrana TGR5 en las células

de los tejidos placentarias". Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2008-2009.

Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña. VI Convocatoria. "Investigación de nuevas dianas moleculares para la detección y la quimioterapia del colangiocarcinoma". Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2009-2012.

ÍNDICE

1. OBJETIVOS

2. INTRODUCCIÓN

2.1. EL HÍGADO

2.1.1. Anatomía e Histología

2.1.2. Los Ácidos Biliares

2.1.3. Los Pigmentos Biliares

2.2. LA FUNCIÓN EXCRETORA DEL HÍGADO ADULTO

2.2.1. Captación hepatocelular de compuestos colefílicos

2.2.2. Eflujo hepatocelular de compuestos colefílicos

2.3. LA FUNCIÓN EXCRETORA DEL HÍGADO FETAL

2.3.1. Excreción de ácidos biliares por el hígado fetal

2.3.1. Excreción de pigmentos biliares por el hígado fetal

2.4. LA PLACENTA

2.4.1. Anatomía y Fisiología de la placenta

2.4.2. Circulación placentaria

2.4.3. Niveles de protección de la barrera placentaria

2.4.4. El papel de la placenta en la excreción de compuestos colefílicos fetales

2.4.5. Mecanismos de protección de la barrera placentaria frente a fármacos y toxinas

2.5. RECEPTORES NUCLEARES

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material Biológico

3.1.2. Productos

3.1.3. Medios Instrumentales

3.2. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES

3.2.1. Síntesis del ácido [14C]-taurosulfolitocólico

3.2.2. Síntesis de colilglicilamido fluoresceína

3.3. EXPERIMENTOS IN VIVO EN RATAS GESTANTES

3.3.1. Modelo de colestasis obstructiva

3.3.2. Modelo de placenta de rata perfundida in situ

3.4. AISLAMIENTO DE TROFOCITOS DE PLACENTA HUMANA

3.5. CULTIVOS CELULARES

3.5.1. Exposición de las células en cultivo a compuestos colefílicos y fármacos

3.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm POR PCR CUANTITATIVA

3.6.1. Extracción de ARN total

3.6.2. Transcripción reversa

3.6.3. Diseño de cebadores y sondas Taíman

3.6.4. Realización de la PCR cuantitativa

3.6.5. Cuantificación de los resultados

3.6.6. Electroforesis en gel de agarosa

3.7. CLONACIÓN DE BCRP HUMANA EN EL VECTOR pSPORT-1 PARA LA SÍNTESIS IN VITRO DE SU ARNm

3.7.1. Obtención del ADNc del gen ABCG2

3.7.2. Obtención y propagación del plásmido de origen pGEM-BCRP

3.7.3. Obtención y propagación del plásmido de destino pSPORT1-BCRP

3.7.4. Transformación mediante choque térmico de bacterias competentes

3.7.5. Obtención y purificación del ADN plasmídico de bacterias transformadas

3.7.6. Congelación de bacterias transformadas

3.8. SÍNTESIS IN VITRO DE ARNm DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

3.9. EXPERIMENTOS EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS

3.9.1. Extracción y selección de los oocitos

3.9.2. Microinyección del ARNm en los oocitos

3.9.3. Estudios funcionales de los transportadores de membrana en los oocitos

3.9.4. Efecto de esteroides colestáticos sobre el transporte mediado por BCRP en los oocitos

3.10. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

3.10.1. Obtención de las muestras

3.10.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

3.10.3. Inmunodetección

3.11. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.11.1. Obtención de muestras

3.11.2. Inmunodetección

3.11.3. Controles negativos

3.12. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.12.1. Valoración del ARN por el método del RiboGreen

3.12.2. Valoración del ADN por el método del PicoGreen

3.12.3. Determinación de la viabilidad celular

3.12.4. Determinación de proteínas

3.12.5. Determinación de compuestos fluorescentes en células

3.12.6. Determinación de radiactividad

3.12.7. Determinación de urea en suero

3.12.8. Determinación de pigmentos biliares por espectrofotometría

3.12.9. Determinación de pigmentos biliares por HPLC

3.12.10. Determinación de ácidos biliares por LC-MS-MS

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN DE TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS COLEFÍLICOS EN LA PLACENTA HUMANA

4.1.1. Cuantificación de los niveles de expresión de transportadores de aniones orgánicos colefílicos en cultivos primarios de trofocitos humanos y líneas celulares de coriocarcinoma humano

4.1.2. Inmunolocalización de transportadores de aniones orgánicos colefílicos en cortes de placenta humana a término

4.1.3. Localización subcelular de los transportadores de aniones orgánicos colefílicos en las células BeWo y en trofocitos aislados de placentas humanas a término

4.1.4. Cuantificación de los niveles de expresión de receptores nucleares en cultivos primarios de trofocitos humanos y líneas celulares de coriocarcinoma humano.

4.2. EXCRECIÓN DE BILIVERDINA POR EL BINOMIO PLACENTA-HÍGADO MATERNO

4.2.1. Transporte de biliverdina por el binomio placenta-hígado materno

4.2.2. Mecanismos de captación de biliverdina por la placenta de rata

4.2.3. Cuantificación de los niveles de expresión de la enzima Bvra en el eje hígado materno-placenta-hígado fetal

4.3. EFECTO DE MODULADORES DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ABC EN CÉLULAS DE PLACENTA IN VITRO

4.4. PAPEL DE BCRP EN EL TRANSPORTE DE ÁCIDOS BILIARES

4.4.1. Determinación de la capacidad de BCRP para transportar ácidos biliares utilizando la sublínea celular WIF-B9/R como modelo in Vitro

4.4.2. Clonación de la BCRP humana y síntesis de su ARNm

4.4.3. Expresión funcional de BCRP en oocitos de rana *Xenopus laevis*

4.4.4. Capacidad de BCRP expresada en oocitos de rana *Xenopus laevis* para transportar ácidos biliares

4.4.5. Efecto del 17 β GE sobre la funcionalidad de BCRP expresada en oocitos de rana *Xenopus laevis*

5. CONCLUSIONES

6. ENGLISH SUMMARY

7 BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ABC: ATP-Binding Cassette
AC: Ácido cólico.
ADNc: ADN complementario.
AEDT: Ácido etilendiamino tetraacético.
APAP: acetaminofeno
ARNr: ARN ribosómico
BCRP: Breast cancer resistance protein
BSEP: Bile salt export pump.
BSP: Bromosulfoftaleína.
BR: Bilirrubina.
BV: Biliverdina
BVR α : Biviverdina reductasa alfa
CAR: Constitutive Androstane Receptor
CGamF: colilglicilamido fluoresceína
CK7: Citoqueratina-7 humana
Ct: ciclo umbral
Dapi: 4,6-diamidino-2-fenilindol
DEPC: Dietilpirocarbonato.
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF: Dimetilformamida
DMSO: Dimetilsulfóxido.
EEM: Error estándar de la media.
Et₃N: Trietilamina anhidra
FAM: 6-carboxifluoresceína
FITC: isotiocianato de fluoresceína
GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada.
GC: Ácido glicocólico.
GLUD: Glutamato deshidrogenada.
GSH: Glutation reducido.
17 β GE: 17 β -glucurónido de estradiol
FXR: Farnesoid X Receptor.
HBS: Hanks Balanced Salts.
Hepes: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazintansulfónico.
HNF: Hepatic Nuclear Factor.
LpII: Lactógeno placentario de rata tipo II.
LXR: Liver X Receptor.
MDR: Multidrug resistance.
MEM: Minimum Essential Medium Eagle
MOPS: Ácido morfolino propansulfónico.
MRP: Multidrug resistance associated protein.
MTS: Sal de tetrazolio.
NTCP: Sodium taurocholate cotransporting polypeptide.
OATP: Organic anion transporting polypeptide.
ORF: Open reading frame.
PBS: Tampón fosfato salino.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PMS: Metasulfato de fenazina.
PXR: Orphan Nuclear Pregnane X Receptor"
QDC: Ácido quenodesoxicólico.
RAR: Receptor del ácido retinoico
R²: Coeficiente de correlación.
Rf: Coeficiente de retención.

RN: Rojo neutro.
RXR: Receptor del ácido 9 cis-retinoico.
SDS: Dodecil sulfato sódico.
SHP: Smal Heterodimer Patner.
SLC: Ácido sulfolitocólico.
TC: Ácido taurocólico.
TAMRA: 6-carboxitetrametilrodamina.
Tm: Temperatura de desnaturalización.
TLC: Ácido taurolitocólico.
TSLC: Ácido taurosulfolitocólico.
TEMED:
T-PBS: PBS –Tween 1%.
Ve-Cad: VE-caderina.

Una de las funciones principales del hígado adulto es la eliminación a bilis de una gran variedad de aniones orgánicos colefílicos, como ácidos biliares, pigmentos (fundamentalmente porfirinas, biliverdina y bilirrubina), hormonas esteroideas y xenobióticos.

Durante la vida intrauterina se sintetizan cantidades elevadas de algunos de estos compuestos, sin embargo, su eliminación por parte del hígado y riñones fetales es escasa debido a la inmadurez de la función excretora de estos órganos, por lo que la placenta primero y luego el hígado materno, con una pequeña contribución del riñón materno, se encargan de su excreción.

Desde hace años, nuestro grupo ha estudiado la existencia de sistemas de transporte implicados en la transferencia placentaria de sustancias colefílicas que juegan un papel más importante que la difusión simple en la función excretora “de tipo hepatobiliar” de la placenta y le confieren características vectoriales en dirección feto a madre.

Los estudios funcionales revelan que la entrada de aniones orgánicos colefílicos desde la sangre fetal al trofoblasto es llevada a cabo por un mecanismo independiente de un gradiente de sodio, lo que sugiere que en este paso participan miembros de la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs, “Organic Anion Transporting Polypeptides”), principales responsables de la captación sodio-independiente de un gran número de fármacos y compuestos endógenos en los hepatocitos. Por otra parte, los mecanismos de eflujo de aniones orgánicos colefílicos son en general vectoriales y dirigidos por sistemas dependientes de la hidrólisis de ATP, pertenecientes a varias subfamilias de proteínas ABC (“ATP-binding cassette”).

Aunque en la última década se han identificado varias isoformas de OATPs y ABCs en la placenta, que podrían estar implicadas en la función excretora y de protección de este órgano, la presencia de otras isoformas aún no se ha estudiado.

Basándonos en estos antecedentes nos planteamos como **objetivo de esta Tesis Doctoral** profundizar en la identificación y caracterización de los transportadores involucrados en la función excretora “de tipo hepatobiliar” de la placenta y en los mecanismos de regulación de estas proteínas para evaluar la capacidad de protección de la barrera placentaria.

Para alcanzar este objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1º: Completar el cuadro de mecanismos responsables de la función excretora “de tipo hepatobiliar” en la placenta mediante la identificación y localización subtisular de transportadores de aniones orgánicos colefílicos.

Objetivo 2º: Evaluar la posible utilidad de las líneas celulares derivadas de coriocarcinoma humano, BeWo, JAr y Jeg-3, como modelos *in vitro* para realizar

estudios de modulación de la expresión de los transportadores de membrana involucrados en la función excretora y de protección de la placenta tras su exposición a distintos compuestos.

Objetivo 3º: Determinar la participación de OATPs en el transporte transplacentario de pigmentos biliares fetales como la biliverdina fetal.

Objetivo 4º: Dilucidar aspectos funcionales de proteínas ABC presentes en el trofoblasto humano, mediante el desarrollo de una variante del sistema de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de *Xenopus laevis* que permita llevar a cabo estudios de eflujo de aniones orgánicos colefílicos.

2.1. EL HIGADO

2.1.1. Anatomía e histología

El hígado es la víscera de mayor tamaño que hay en el organismo, constituye aproximadamente el 2,5% del peso corporal en adultos sanos y un 5% en el recién nacido. Es un órgano marrón-rojizo, situado debajo del diafragma. Dentro de las funciones del hígado se distinguen: funciones vasculares, de almacenaje y filtrado de la sangre; funciones metabólicas, ya que participa en el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas; y funciones secretoras y excretoras, puesto que es responsable de la formación de bilis y de la excreción de fármacos, hormonas y otras sustancias.

El hígado recibe aporte sanguíneo a través de la arteria hepática procedente del tronco celíaco que aporta sangre rica en oxígeno y constituye entre el 20-35% del flujo hepático y a través de la vena porta procedente del bazo, páncreas, estómago e intestino que aporta entre el 65-80% de la sangre que llega al hígado aunque su concentración en oxígeno es menor que la de la sangre procedente de la arteria hepática.

Se puede considerar que la unidad estructural y funcional del parénquima hepático es el acino hepático formado por la porción del tejido hepático asociada a las ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática y aun conducto biliar, siendo así el espacio porta el organizador central del funcionamiento hepático. En el acino, la sangre procedente de la arteria hepática y de la vena porta se mezcla en los sinusoides hepáticos, espacios vasculares libres entre las láminas de células epiteliales o hepatocitos, y es drenada por las venas centrolobulillares, que convergen para formar la vena suprahepática (Arias et al., 1982). Microscópicamente, se puede observar que los hepatocitos se disponen formando cordones desde la entrada portal hacia la salida venosa. Esta estructura se repite por todo el parénquima.

Se pueden distinguir tres zonas acinares, denominadas zona 1, 2 y 3 de Rappaport (Rappaport, 1973), de tal manera que los hepatocitos situados cerca de los espacios porta (zona 1) son los primeros expuestos a la sangre aferente y reciben las concentraciones más elevadas de solutos de procedencia arterial o portal, mientras que los hepatocitos centrilobulillares (zona 3) reciben menores concentraciones de oxígeno, señales hormonales, etc (Gumucio, 1983). En la figura 1 se muestra el esquema de un acino hepático. Las flechas indican la circulación de la sangre a través del acino.

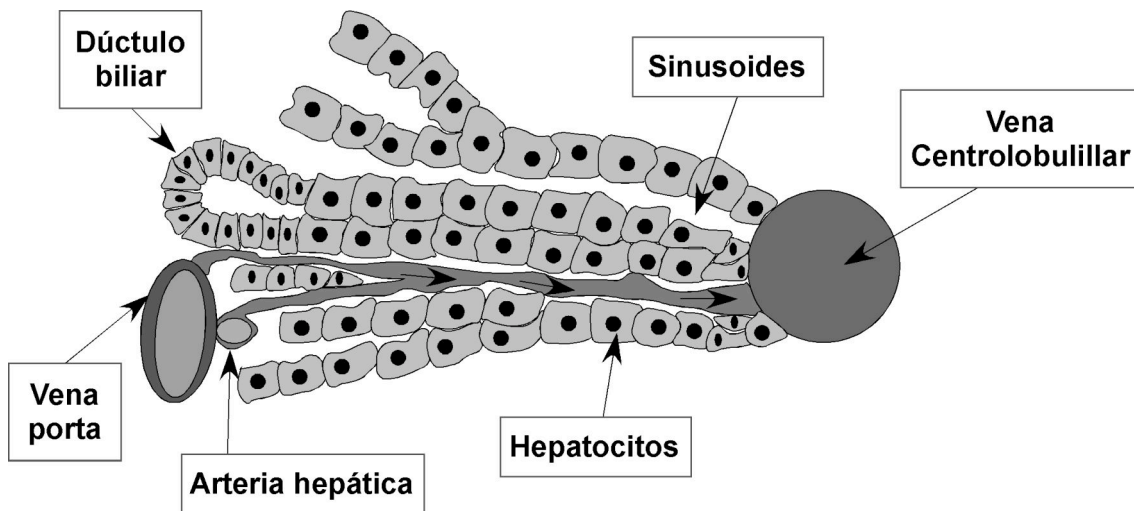


Figura 1. Esquema de un acino hepático. Las flechas indican la circulación de la sangre a través del acino, desde las ramas de la vena porta y arteria hepática hacia la vena centrilobulillar, a través de los sinusoides.

A nivel celular, en el hígado se distinguen: células epiteliales, como los hepatocitos que son la fracción más abundante y se agrupan en placas de una o dos células de espesor, y las células ductulares biliares, ubicadas en los ductulos biliares; células endoteliales, ubicadas en los sinusoides a ambos lados de las placas de hepatocitos; células de Kupffer o macrófagos del hígado, y células estrelladas.

▪ El hepatocito

Los hepatocitos son las unidades funcionales principales del hígado. Representan alrededor del 60% de las células en el hígado. A pesar de que su función, estructura y forma dependen de la posición específica en el hígado (particularmente en las distintas zonas acinares), cada hepatocito individual tienen la capacidad potencial para realizar todas las funciones.

El hepatocito es una célula poliédrica con ocho o más caras. Presenta una polaridad muy marcada, debido a que posee una membrana celular con tres regiones de distinta especificidad morfológica y funcional (Evans, 1980; Meier, 1988). La membrana sinusoidal está orientada hacia el polo sanguíneo, es decir hacia el espacio perisinusoidal o espacio de Disse. A través de esta membrana se produce un importante tránsito de sustancias gracias a las numerosas microvellosidades que aumentan (aproximadamente seis veces) la superficie de intercambio. La membrana lateral es la membrana que se interpone entre hepatocitos colindantes; sus microvellosidades son más cortas y están en menor cuantía que en la membrana

sinusoidal. En esta membrana existen estructuras celulares cuya función es mantener la adhesión mecánica y la cohesión funcional entre los hepatocitos adyacentes (Meier, 1988), como: “tight junctions” o “zonulae occludens”, que son uniones fuertes entre células que controlan en parte el paso de fluidos entre los hepatocitos; desmosomas o “maculae adherents”, que son estructuras de unión interhepatocitarias cuya función es dotar de resistencia mecánica a las uniones intercelulares; y “gap junctions”, que son canales de membrana intercelulares que unen células vecinas y que median intercambios recíprocos de pequeñas moléculas e iones, incluyendo segundos mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) o el inositol trifosfato y el calcio, entre células adyacentes en contacto.

Por último, la membrana canalicular es una invaginación de aproximadamente el 13% de la superficie de la membrana celular del hepatocito, con forma de medio cilindro, que al unirse a otra formación equivalente del hepatocito adyacente, forma el canalículo biliar. Esta membrana también presenta numerosas microvellosidades irregulares que sobresalen en la luz canalicular. Alrededor de los canalículos biliares hay una zona de citoplasma pobre en orgánulos, denominada ectoplasma pericanalicular, que posee filamentos y microtúbulos de suma importancia para el mantenimiento de la forma del canalículo y de la secreción biliar (Meier, 1988; Watanabe et al., 1991).

2.1.2. Los ácidos biliares

Los ácidos biliares son ácidos carboxílicos que se forman en el hígado como resultado del metabolismo del colesterol, obteniéndose compuestos hidrosolubles, fácilmente excretables y con utilidad en los procesos digestivos. Presentan una estructura anfipática con una región hidrófila y otra hidrófoba, que les confiere propiedades detergentes. Esta estructura peculiar les permite asociarse entre sí y formar micelas a partir de una concentración determinada. Los ácidos biliares se secretan en la bilis durante el proceso digestivo y al formar estas micelas engloban en su interior a los lípidos de las grasas, las emulsionan y facilitan su absorción. Una vez realizada su función en el intestino, son reabsorbidos en el íleon y a través de la vena porta regresan al hígado, desde donde vuelven a ser secretados en la bilis. Este ciclo, denominado *circulación enterohepática* se lleva a cabo unas 6-10 veces al día (3-4 veces por comida) con escasas pérdidas fecales; los ácidos biliares que se pierden son reemplazados por moléculas de nueva síntesis.

Respecto a su estructura química, los ácidos biliares son esteroides con 24 átomos de carbono, saturados, mono o polihidroxilados y con un grupo carboxilo en la cadena lateral, que puede estar conjugado con glicina o taurina (Lester, 1983). Los ácidos biliares primarios son el ácido cólico (AC: 3 α , 7 α , 12 α -trihidroxi-5 β -colanoico) y el ácido quenodesoxicólico (QDC: 3 α , 7 α -dihidroxi-5 β -colanoico). Se sintetizan directamente en el hígado y a su paso por el intestino las bacterias de la flora intestinal los degradan

dando lugar a los denominados ácidos biliares secundarios. Éstos carecen del grupo hidroxilo en posición 7 α y son el ácido desoxicólico (DC), procedente del AC, y litocólico (LC), procedente del QDC. Además de ésta existen otras transformaciones minoritarias que producen una gran variedad de derivados de los ácidos biliares primarios. En los fluidos biológicos la mayoría de los ácidos biliares se encuentra en forma de sales, formas ionizadas solubles de estos compuestos.

En la figura 2 se muestra la estructura química del ácido cólico.

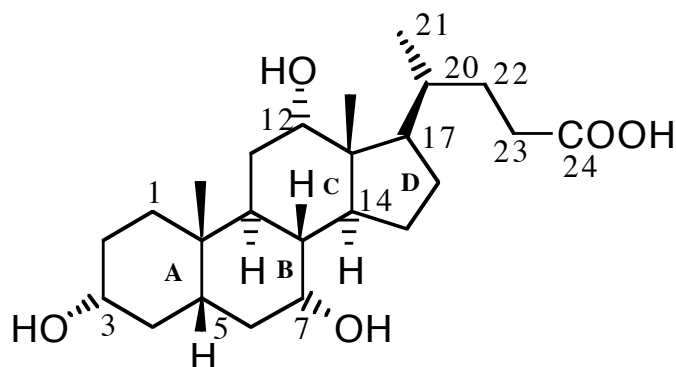


Figura 2. Estructura química de un ácido biliar típico, el ácido cólico (AC).

▪ Biosíntesis de los ácidos biliares

Los ácidos biliares primarios se sintetizan a partir del colesterol a través de dos vías:

a) la vía clásica o vía neutra, así denominada porque los compuestos intermediarios son esteroides neutros. Sus productos principales son el AC y el QDC, y el paso limitante es la hidroxilación en el C7 del núcleo esteroideo llevada a cabo por la enzima microsomal colesterol 7 α -hidroxilasa (gen *CYP7A1*).

b) la vía alternativa o vía ácida, donde los compuestos intermediarios tienen carácter ácido. El producto mayoritario de esta vía es el QDC (Bjorkhem, 1992), y el paso limitante es la hidroxilación en el C27 de la cadena lateral llevada a cabo por la enzima mitocondrial esterol 27-hidroxilasa (gen *CYP27*).

La contribución relativa de ambas vías a la biosíntesis global de ácidos biliares no es muy clara. Parece ser que la vía clásica desempeña el papel principal en la biosíntesis de ácidos biliares en humanos en condiciones fisiológicas, y que, en estas condiciones la vía alternativa apenas contribuye a la síntesis. Sin embargo, esta vía puede adquirir un papel fundamental en pacientes con enfermedades hepáticas, y parece ser la vía predominante durante la vida fetal (Deleze et al., 1978).

▪ Conjugación de los ácidos biliares

Las principales biotransformaciones que experimentan los ácidos biliares son conjugaciones con aminoácidos (glicina o taurina), sulfato o ácido glucurónico. A diferencia de la amidación con glicina o taurina, la glucuronidación o la sulfatación son vías minoritarias en individuos sanos. Sin embargo, cobran importancia en situaciones como la colestasis, en la cual los ácidos biliares se acumulan en el hepatocito donde se sulfatan y glucuronidan para posteriormente ser regurgitados al plasma, desde donde se eliminan por vía renal (Hofmann, 1994).

▪ Papel fisiológico de los ácidos biliares

Los efectos fisiológicos de los ácidos biliares son muy diversos, destacando su papel en la digestión y absorción intestinal de las grasas de la dieta. Entre otras funciones se incluye generar el flujo biliar dependiente de ácidos biliares por su efecto osmótico en la luz canalicular. En este sentido inducen la secreción de lípidos biliares, principalmente fosfolípidos y colesterol, contribuyendo a su homeostasis y modulando su biosíntesis. Parecen regular también la actividad de los receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que determinan a la larga los niveles séricos de estas moléculas. Además, colaboran en el transporte de sustancias hidrofóbicas en bilis, tales como el colesterol y los fosfolípidos, gracias a la formación de micelas, y actúan como tampones para el Ca^{2+} . Estas micelas, a nivel intestinal, permiten emulsionar las grasas y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) facilitando así su absorción. También activan lipasas intestinales, modulan la actividad de proteasas, la motilidad intestinal, la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina (Combettes et al., 1992; Izukura et al., 1991), e inducen la secreción de agua y electrolitos.

Recientemente se ha descrito que los ácidos biliares intervienen en la regulación del metabolismo de lípidos y de la glucosa (Houten et al., 2006). También se ha confirmado que los ácidos biliares inhiben la obesidad inducida por la dieta y previenen el desarrollo de resistencia a la insulina (Ikemoto et al., 1997). Esto sugiere funciones de estos compuestos en la homeostasis energética.

En los últimos años se ha descrito que los ácidos biliares son moléculas señalizadoras, con funciones sistémicas endocrinas. Son capaces de activar cascadas de protein-quinasas activadoras de miógenos (MAPK, de “mitogen-activated proteinkinases”) (Qiao et al., 2003), son ligandos del receptor acoplado a proteínas G TGR5 (Kawamata et al., 2003) y activan receptores hormonales nucleares como FXR (de “farnesoil X receptor”) (Houten et al., 2006).

Además, se ha demostrado su participación en el control de la proliferación y apoptosis en los tejidos donde los ácidos biliares se encuentran en concentraciones elevadas (Benz et al., 1998; Marin et al., 1993).

2.1.3. Los pigmentos biliares

Las hemooxigenasas (HO) microsomales catalizan el paso limitante en la degradación del grupo hemo resultando en la liberación del ión ferroso (Fe^{2+}) y generando BV y monóxido de carbono (CO) (Maines, 1997).

En principio, la rotura del anillo hemo puede ocurrir en cada uno de los cuatro mesopuentes de carbono, generándose así los cuatro isómeros de BV, denominados $\text{IX}\alpha$, $\text{IX}\beta$, $\text{IX}\gamma$, $\text{IX}\delta$. Sin embargo, las HO abren el anillo hemo con alta selectividad en el puente α , y en vertebrados prácticamente toda la BV formada es del tipo $\text{IX}\alpha$, aunque pequeñas cantidades de los otros tres isómeros se producen en humanos en condiciones normales y patológicas (Yamaguchi and Nakajima, 1995).

Estas enzimas están altamente conservadas encontradas en bacterias, algas, plantas y animales. Hasta el momento se han identificado tres isoenzimas: HO-1, HO-2 y HO-3. La HO-1 (también conocida como “heat shock protein 32”, dada su masa molecular) es la isoforma inducible y está muy expresada en el bazo y en el hígado. Se induce por distintos estímulos incluyendo hipoxia e hiperoxia (Keyse and Tyrrell, 1989; Maines et al., 1993). Diferentes estudios demuestran que la HO-1 tiene un papel citoprotector. Por un lado modula la concentración del hierro intracelular (Balla et al., 1992; Ferris et al., 1999), también participa en la homeostasis del hierro “in vivo” (Baranano et al., 2000), y además, a través de un efecto indirecto mediante la producción de BR (Dore et al., 1999b). Por otra parte, se ha demostrado que en pequeñas cantidades el CO tiene propiedades citoprotectoras, anti-apoptóticas, vasorelajantes y anti-inflamatorias (Ryter and Otterbein, 2004).

La HO-2, también es una proteína de 32 kDa, que está expresada en varios tejidos del organismo y cuya expresión es constitutiva (Maines, 1988). Esta enzima además funciona como sensor de hemo/oxígeno en las células (Lee-Huang et al., 1993). En comparación con las otras dos isoformas, la HO-3 tiene baja actividad catalítica (McCoubrey et al., 1997).

La BV- $\text{IX}\alpha$ producida por la actividad HO es un pigmento verde hidrosoluble y poco tóxico que es reducido por la acción de la biliverdina $\text{IX}\alpha$ reductasa ($\text{BVR}\alpha$) a bilirrubina (BR) $\text{IX}\alpha$, de color amarillo, poco hidrosoluble y potencialmente tóxica. La actividad $\text{BVR}\alpha$ se ha detectado en varios tejidos (McCoubrey et al., 1995), incluida la placenta (McDonagh et al., 1981).

2.2. LA FUNCIÓN EXCRETORA DEL HÍGADO ADULTO

Como hemos mencionado, el hígado juega un papel determinante en la excreción de sustancias potencialmente tóxicas a la bilis que se denominan en su conjunto compuestos colefílicos, dada su afinidad por la vía biliar. Entre ellos se encuentran xenobióticos y compuestos endógenos, producidos por el organismo, como los ácidos biliares y los pigmentos biliares.

Algunos compuestos colefílicos son captados por el hígado y excretados a bilis sin sufrir procesos de biotransformación a su paso por los hepatocitos. En estos casos, la destoxificación implica únicamente mecanismos de transporte de fase 0 (captación) y de fase III (secreción). Sin embargo, en otros casos algunos compuestos colefílicos sufren modificaciones químicas durante su tránsito transcelular producidas por reacciones de fase I (oxido/reducciones) y/o de fase II (conjugaciones con grupos poliatómicos) (Vavricka et al., 2002).

En la figura 3 se muestra una representación esquemática de los principales transportadores de compuestos colefílicos que están presentes en los hepatocitos.

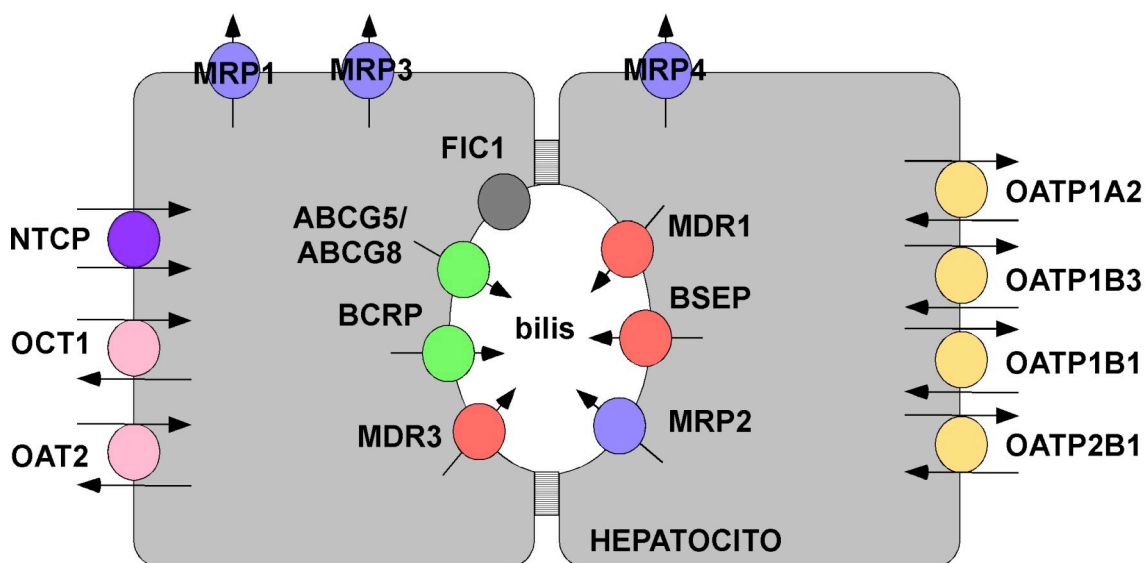


Figura 3. Representación esquemática de los sistemas de transporte de compuestos colefílicos en los hepatocitos.

2.2.1. Captación hepatocelular de compuestos colefílicos

La membrana sinusoidal o basolateral de los hepatocitos está en contacto directo con la sangre portal a través de las células endoteliales de los sinusoides y del espacio de Disse. Aunque algunos compuestos, como la BR no conjugada, pueden alcanzar el

interior de los hepatocitos por difusión (Zucker and Goessling, 2000), la mayoría de los compuestos colefílicos son captados a través de mecanismos de transporte dependientes o independientes de sodio localizados en esta membrana (figura 3). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de transportadores de membrana SLC (del inglés “Solute Carriers”).

▪ Captación sodio-dependiente

El transporte dependiente de sodio es realizado fundamentalmente por el co-transportador de ácidos biliares y sodio (NTCP de “Na-Taurocholate Cotransporting Polypeptide”, gen *SLC10A1*). Esta proteína constituye el principal sistema de transporte de sales biliares conjugadas desde la sangre portal al interior de los hepatocitos (Meier and Stieger, 2002).

También pertenece a esta familia de transportadores IBAT (de “Intestinal bile acid transporter”, gen *SLC10A2*). Localizado en la membrana apical de ileocitos, es el principal responsable de la captación intestinal de ácidos biliares. Su expresión también se ha detectado en el túbulo proximal renal (Craddock et al., 1998) y colangiocitos (Lazaridis et al., 1997).

NTCP es una glicoproteína de aproximadamente 50 kDa, con 7 dominios transmembrana. Como su nombre indica, se caracteriza por llevar a cabo una eficaz captación de ácidos biliares mediante cotransporte con sodio, interaccionando con los ácidos biliares a través de una región de la molécula que incluye la cadena lateral (Kramer et al., 2001). La estequiometría del transporte es de 2 Na⁺/1 ácido biliar, a favor del gradiente de este ión (Hagenbuch and Meier, 1996). El gradiente de sodio necesario para el transporte se debe a la actividad Na⁺/K⁺-ATPasa presente en la membrana sinusoidal del hepatocito (Meier, 1989).

Dentro de los sustratos de NTCP se encuentran principalmente ácidos biliares conjugados con glicina y taurina di- y tri-hidroxilados, como el ácido taurocólico (TC), ácido glicocólico (GC), ácido tauroquenodesoxicólico (TQDC) o el ácido tauroursodesoxicólico (TUDC), entre otros. También transporta, aunque con menor eficacia, ácidos biliares no conjugados, como el AC, y otras moléculas, como esteroides sulfatados (dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) y estrona sulfato (ES), aniones orgánicos como la bromosulfoftaleína (BSP) y hormonas tiroideas (Friesema et al., 1999; Meier et al., 1997). Además, se ha comprobado su capacidad para transportar derivados de fármacos y ácidos biliares que conservan la cadena lateral del ácido biliar original, como es el caso del conjugado clorambucilo-taurocolato (Kullak-Ublick et al., 1997).

▪ Captación sodio-independiente

A diferencia del transporte mediado por NTCP, la captación de compuestos colefílicos independiente de Na^+ no puede ser atribuida a la función de un único transportador, sino que la llevan a cabo varios sistemas de transporte situados en la membrana basolateral de los hepatocitos. Entre ellos destacan los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs de “Organic Anion-Transporting Polypeptides”, genes *SLCO*), codificados por la familia de genes *SLCO* antes denominada *SLC21* (Hagenbuch and Meier, 2004).

Hasta el momento se han identificado 52 miembros de esta familia de los que se encuentran 11 en humanos (Hagenbuch and Meier, 2004). En el hígado humano se expresan fundamentalmente las isoformas OATP1A2 (*SLCO1A2*), OATP1B1 (*SLCO1B1*), OATP1B3 (*SLCO1B3*) y OATP2B1 (*SLCO2B1*) (Kullak-Ublick et al., 2001).

Una característica importante de los OATPs es la amplia variedad de sustratos que transportan, entre los que destacan ácidos biliares, colorantes orgánicos, conjugados de esteroides, hormonas tiroideas, BR conjugada (Cui et al., 2001) y no conjugada (Briz et al., 2003b), oligopéptidos de carácter aniónico, numerosos fármacos y otras sustancias xenobióticas (Hagenbuch and Meier, 2004). Además, algunos derivados de fármacos y ácidos biliares, como el clorambucilo-TC o como los derivados del cisplatino (Bamets) sintetizados por nuestro grupo de investigación, también son sustratos de estos transportadores (Briz et al., 2002; Kullak-Ublick et al., 1997).

La captación de ácidos biliares por los OATPs es cuantitativamente menos importante que la sodio-dependiente mediada por NTCP (Kullak-Ublick et al., 2000). Sin embargo, ácidos biliares primarios, como el AC y el QDC, son captados por los hepatocitos a través de transportadores independientes de sodio como los OATPs (Meier and Stieger, 2002).

Aunque la especificidad de sustrato de las cuatro principales isoformas presentes en hígado humano se solapa en gran medida, cada una de ellas presenta ciertas peculiaridades. En lo que se refiere al transporte de ácidos biliares, OATP1B1 es la isoforma más relevante en la captación de estas moléculas (Kullak-Ublick et al., 2000; Meier and Stieger, 2002) a nivel hepático, mientras que la capacidad de OATP1B3 ha sido muy discutida (Konig et al., 2000; Kullak-Ublick et al., 2001; Kullak-Ublick et al., 2000). En los últimos años, estudios realizados en oocitos de *Xenopus laevis*, han demostrado que OATP1B3 media el transporte de ácidos biliares libres y conjugados (Briz et al., 2006; Kullak-Ublick et al., 2001), así como también un sustrato típico de este transportador, el 17β -D-glucurónido de estradiol (17β GE) (Konig et al., 2000).

Sin embargo, y aunque originalmente OATP1A2 fue clonado del hígado humano y es una proteína capaz de transportar ácidos biliares como el TC, su expresión en este tejido es baja (Briz et al., 2003b; Kullak-Ublick et al., 1995), por lo tanto su contribución

al transporte hepático de ácidos biliares es minoritaria (Meier and Stieger, 2002). Por otra parte, la presencia de éste en los colangiocitos (Chignard et al., 2001) indica que puede participar en la reabsorción de estas moléculas desde la bilis hacia el plexo capilar periductular.

Otro miembro de esta familia de transportadores que se ha encontrado en el hígado y que parece tener capacidad para transportar algunos ácidos biliares es OATP4A1, aunque su sustrato característico son las hormonas tiroideas (Fujiwara et al., 2001). Sin embargo, OATP2B1 no transporta sales biliares (Kullak-Ublick et al., 2001; Tamai et al., 2000), aunque sí lo hace su ortólogo de rata *Oatp2b1* (Nishio et al., 2000).

En cuanto al transporte de BR, se ha descrito que la BR no conjugada es captada eficazmente por las proteínas OATP1B1 y OATP1B3 (Briz et al., 2003b; Cui et al., 2001).

El mecanismo de transporte de los Oatps/OATPs parece ser un intercambio de aniones, uniendo la captación celular de compuestos orgánicos, con el eflujo de bicarbonato, glutatión y/o conjugados de glutatión (Li et al., 1998; Li et al., 2000; Satlin et al., 1997; Shi et al., 1995).

Pero el mecanismo exacto por el cual median la captación de aniones orgánicos no se conoce con exactitud para todos ellos. En oocitos de *Xenopus laevis* que expresaban *Oatp1a1* y *Oatp1a4* de rata se pudo determinar que el GSH intracelular jugaba un papel importante en el mecanismo de transporte de estas proteínas (Gao et al., 1999; Li et al., 1998; Li et al., 2000).

Por otra parte, estudios realizados utilizando cultivos celulares de origen hepático, determinaron que el intercambio de aniones orgánicos por los Oatps/OATPs parecía ser dependiente de pH y electroneutro (Satlin et al., 1997). En trabajos realizados por nuestro grupo se comprobó que el transporte de ácidos biliares mediado por Oatps se veía afectado por la acidificación intracelular, posiblemente debido a cambios en las fuerzas motrices de los transportadores, y en particular a la respuesta a la protonación de las proteínas implicadas en el proceso (Marin et al., 2003).

Otros transportadores sodio-independientes presentes en la membrana sinusoidal de los hepatocitos y que colaboran en la captación hepática de una gran variedad de moléculas orgánicas, son los de transportadores de aniones (OATs, de "Organic Anion Transporters") o de cationes (OCTs, de "Organic Cation Transporters") orgánicos, codificados por la familia de genes *SLC22A* (Suzuki and Sugiyama, 2000).

2.2.2. Eflujo hepatocelular de compuestos colefilicos

Uno de los pasos limitantes en el conjunto de los procesos de transporte de compuestos colefilicos desde la sangre hasta la bilis, es la secreción canalicular (Erlinger, 1996). La mayoría de los sistemas de transporte canaliculares implicados en la formación de bilis pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC (de “ATP-Binding Cassette”) (Gatmaitan and Arias, 1995) que se caracterizan por ser proteínas integrales de membrana capaces de translocar una gran variedad de sustancias a través de las membranas celulares utilizando la energía de la hidrólisis del ATP (Markus et al., 2009).

Se han caracterizado más de 48 genes *ABC* en humanos, que pueden clasificarse en siete subfamilias basándose en sus características filogenéticas y su secuencia de aminoácidos (Dean and Annilo, 2005). Estas proteínas participan en numerosos procesos fisiológicos, como la homeostasis de esteroides, mecanismos inmunes y en el transporte de sustancias endógenas y exógenas como azúcares, aminoácidos, metales, iones, péptidos y proteínas, así como un gran número de compuestos y metabolitos hidrofóbicos.

En la figura 3 se muestra la localización de las principales proteínas ABC presentes en la membrana apical o basolateral de los hepatocitos. Dependiendo de su localización en la membrana plasmática de estas células, los transportadores ABC se pueden dividir en transportadores de fase IIIa, aquellos responsables del eflujo de compuestos a la bilis, o transportadores de fase IIIb, que se encuentran localizados en la membrana basolateral y expulsan compuestos a la circulación general. Dentro de los transportadores de fase IIIa destacan varios miembros de las subfamilias de genes *ABCB*, *ABCC* y *ABCG*. Por el contrario, los transportadores de fase IIIb más relevantes pertenecen únicamente a la subfamilia *ABCC* (Marin et al., 2008).

Las proteínas ABC están formadas por cuatro dominios, dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a nucleótidos (“Nucleotide-binding domain” o “ATP binding cassette domains”). Mientras que los dominios de unión a nucleótidos son responsables de la unión e hidrólisis del ATP, y consecuentemente responsables de generar la fuerza motriz para el transporte, los dominios transmembrana median el transporte vectorial de los sustratos a través de las membranas celulares.

Debido a su sustrato común (ATP), los dominios de unión a nucleótidos contiene varias regiones conservadas, incluyendo las regiones Walker A y Walker B, comunes a todas las proteínas ABC, y la denominada “ABC signature”, la cual es específica de cada subfamilia. Por el contrario, los dominios transmembrana, habitualmente formados por seis α -hélices, presentan secuencias mucho más diversas que reflejan la gran diversidad de sustratos transportados por estas proteínas (Seeger and van Veen, 2009).

En función a su estructura, los transportadores ABC también se denominan “full transporters”, cuando contienen los cuatro dominios, o “half transporters”, cuando sólo están formados por un dominio de unión a ATP y un dominio transmembrana por lo que requieren ensamblarse con otro “half transporter” formando homodímeros o heterodímeros para dar lugar al transportador funcional con la estructura completa. Los primeros se localizan en la membrana plasmática mientras que los segundos se encuentran generalmente en membranas intracelulares (Bates et al., 2001). En la figura 4 se muestra la topología de tres representantes de las subfamilias *ABCB* (MDR1), *ABCC* (MRP1) y *ABCG* (BCRP) en la membrana.

El mecanismo de translocación de los sustratos de un lado a otro de la membrana es aún discutido. En general se acepta que el sustrato se une al sitio de máxima afinidad del transportador (bien desde el citosol o bien desde la membrana) y que tras la unión y/o la hidrólisis de 2 ATP (también denominado “ciclo catalítico de transportadores ABC”), la afinidad del sitio de unión al sustrato disminuye causando la liberación del mismo en el lado opuesto de la membrana (Seeger and van Veen, 2009).

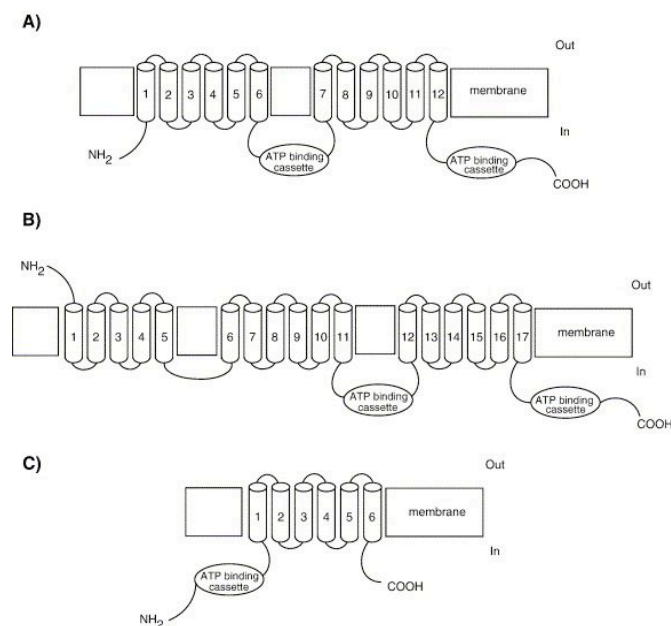


Figura 4. Esquemas de la topología en la membrana de las proteínas Pgp (A), MRP1 (B) y BCRP (C).

▪ La subfamilia *ABCB*

Una de los primeros transportadores ABC descritos y mejor caracterizado es MDR1 (de “Multidrug resistance protein 1”, gen *ABCB1*) o P-glicoproteína (Pgp) (Juliano, 1976). Inicialmente se la identificó como la proteína de membrana plasmática responsable del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en células tumorales

(Bosch and Croop, 1996; Goldstein, 1996; Goldstein et al., 1991). En la actualidad está bien establecida su presencia en células sanas como en el borde en cepillo de los túbulos renales apicales, en la membrana canalicular de los hepatocitos, en la membrana apical de los enterocitos y en las membranas luminarias de las células endoteliales capilares del cerebro (Cordon-Cardo et al., 1990). Dada su característica distribución, MDR1 está implicada en los procesos farmacocinéticos de absorción, distribución y eliminación de fármacos (Fromm, 2004; Schinkel, 1998).

A pesar de que se ha convertido en la proteína modelo en muchos de los estudios de caracterización del mecanismo de transporte de las bombas ABC (Seeger and van Veen, 2009), su papel en la formación de la bilis aún no está del todo esclarecido, aunque contribuye a la excreción canalicular de fármacos y otros xenobióticos.

MDR1 está implicada principalmente en el transporte de cationes orgánicos hidrofóbicos (Muller et al., 1994). Además de multitud de fármacos incluyendo glucósidos cardiotrópicos, antihistamínicos, analgésicos narcóticos o inmunosupresores (Chan et al., 2004; Matheny et al., 2001), también son sustratos de MDR1 varios fármacos antitumorales (Marin et al., 2009).

Es interesante señalar que existe una coordinación entre la actividad transportadora de la MDR1 y de las enzimas de fase I y II, como las de la familia del citocromo P450 (CYP) y glutatión-S-transferasas (Gatmaitan and Arias, 1993). En particular, la isoforma CYP3A4, una de las más abundantes en el hígado, junto con la MDR1 se consideran piezas clave en el efecto de primer paso que sufren muchos fármacos (Schuetz et al., 1996), reduciendo su biodisponibilidad a menos de un 50% (Wacher et al., 1998).

Otro miembro de esta familia involucrado en la secreción de compuestos colefílicos al canalículo biliar es MDR3 (gen *ABCB4*), también denominada Mdr2 en roedores (Smit et al., 1993). Esta proteína está implicada en la translocación de fosfatidilcolina desde la cara interna a la cara externa de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Ruetz and Gros, 1994), un papel fundamental para neutralizar el efecto detergente de los ácidos biliares, presentes en la bilis a una concentración elevada. La MDR3 parece que también es capaz de transportar algunos xenobióticos aunque con una eficacia menor que la de MDR1 (Smith et al., 2000).

Otra ATPasa localizada en la membrana canalicular de los hepatocitos y que también transloca fosfolípidos de una cara a otra de la membrana es FIC1. Esta proteína no es un miembro de la familia ABC sino que se trata de una ATPasa de tipo II que transloca aminofosfolípidos de la cara externa a la cara interna de la membrana plasmática, modulando la asimetría de la misma (Mouro et al., 1999).

La bomba exportadora de sales biliares (BSEP; gen *ABCB11*) es el principal mecanismo de secreción de ácidos biliares monoaniónicos conjugados a bilis, con una mayor afinidad por TQDC>TC>TUDC>GC (Byrne et al., 2002; Gerloff et al., 1998).

Además de este papel clave en el transporte vectorial de ácidos biliares, se ha demostrado que también transporta algunos sustratos típicos de MDR1, entre ellos la vinblastina, aunque no otros como daunorrubicina y paclitaxel (Lecureur et al., 2000). Por tanto, el papel de la BSEP en el aclaramiento hepático de fármacos antitumorales es considerablemente más limitado que el papel de MDR1.

En el hombre, BSEP presenta un peso molecular de 140 kDa y de forma similar al resto de miembros de esta familia posee 2 dominios transmembrana, cada uno con 6 segmentos transmembrana, y dos sitios de unión a ATP. Las secuencias de aminoácidos tanto de MDR3 como de BSEP son un 75% y un 50% de similitud con la secuencia de aminoácidos de MDR1, respectivamente (Meier and Stieger, 2002). Estudios mediante la técnica de Northern Blot han revelado que la expresión de la BSEP es predominantemente hepática, localizándose en las microvellosidades canaliculares y en vesículas subcanaliculares de los hepatocitos.

Las mutaciones del gen *ABCB11* humano pueden determinar un subtipo de Colestasis Intrahepática Familiar Progresiva o PFIC2 ("Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis 2"). La PFIC2 cursa con prurito extremo, retraso en el crecimiento y progresión hacia la cirrosis en la primera década de vida.

El buen funcionamiento coordinado de BSEP y MDR3 se relaciona con una adecuada formación de bilis así como con el mantenimiento de una correcta homeostasis lipídica (Meier and Stieger, 2002).

▪ La subfamilia **ABCC**

De esta subfamilia de transportadores ABC, denominadas proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos o MRPs (de "Multidrug resistance-associated protein"), MRP2 (gen *ABCC2*) es la que presenta una mayor expresión en hígado. MRP2 es una proteína de aproximadamente 190 kDa que está localizada en el dominio apical de la membrana plasmática de células polarizadas, como los hepatocitos, epitelio del túbulo proximal renal y epitelio intestinal. Desempeña un papel fundamental en la detoxificación hepática mediando la excreción a la bilis de aniones orgánicos endógenos y xenobióticos (Jedlitschky et al., 1997), contribuyendo a la fuerza motriz que genera el flujo biliar. Su especificidad de sustrato es amplia, aunque tiene una mayor afinidad para los conjugados de glutatión, ácido glucurónico o sulfato y compuestos lipofílicos como leucotrieno C₄, BR y algunos esteroides (Nies and Keppler, 2007). La Mrp2 de rata tiene capacidad de transportar ácidos biliares dianiónicos sulfatados (Akita et al., 2001) y glucuronidados (Keppler et al., 1997). No obstante, entre los sustratos de MRP2 también se encuentran algunos compuestos no conjugados, como la bromosulfoftaleína o el metotrexato. El glutatión reducido y oxidado también son sustratos de MRP2. Esta proteína tiene una gran relevancia

clínica, debido a su capacidad para conferir resistencia a una gran variedad de fármacos antitumorales en tumores sólidos.

La deficiencia adquirida o hereditaria de MRP2 en humanos, como el síndrome de Dubin-Johnson, provoca un incremento en la concentración de glucurónidos de BR en sangre, debido al reflujo de estos compuestos desde los hepatocitos hacia la sangre mediado principalmente por MRP3 (*ABCC3*), localizada en la membrana basolateral de los hepatocitos, como mecanismo compensatorio del deficiente eflujo apical mediado por MRP2 (Kartenbeck et al., 1996).

Otros miembros de la familia MRP descritos en el hígado en humanos y que son los principales componentes del eflujo basolateral de distintos compuestos en los hepatocitos son MRP1 (*ABCC1*), MRP3 y MRP4 (*ABCC4*).

MRP1 inicialmente se clonó de una línea tumoral resistente derivada de pulmón humano (Trauner and Boyer, 2003). En condiciones normales se encuentra poco expresada en hígado y transporta ácidos biliares dianiónicos como TSLC y TQDC (Trauner and Boyer, 2003). La expresión hepática de MRP3 es también muy baja, sin embargo está inducida en pacientes con síndrome Dubin-Johnson y con cirrosis biliar primaria (Konig et al., 1999). MRP3 media el eflujo de ácidos biliares monovalentes como el GC, aunque con baja afinidad ($K_m=0,248$ mM), pero no transporta TC (Zeng et al., 2000). Su expresión hepática está elevada en situaciones que cursan con colestasis, favoreciendo la salida de ácidos biliares a través de la membrana basolateral de los hepatocitos para su posterior excreción renal (Trauner and Boyer, 2003). Aunque su papel en el eflujo de ácidos biliares no está claro ya que al menos en ratones no parece contribuir a la homeostasis de estas moléculas (Zelcer et al., 2006).

Tanto MRP1 como MRP3 también participan en el transporte de glucurónidos y conjugados de glutatión de distintos compuestos exógenos (Akita et al., 2001).

Cuando la ruta de excreción biliar no es funcional, como ocurre en colestasis o endotoxemia, se induce la expresión de MRP1 y MRP3 (Donner and Keppler, 2001; Soroka et al., 2001; Vos et al., 1998), que en condiciones normales están muy poco expresadas (Ogawa et al., 2000; Roelofsen et al., 1997). Este hecho, no es más que una respuesta adaptativa para reducir los efectos citotóxicos producidos por la acumulación de compuestos colefílicos, mediante su transporte de nuevo a la circulación sistémica para su posterior eliminación por vía renal (Tanaka et al., 2002).

En cuanto a MRP4, recientemente se ha demostrado que esta bomba cotransporta ácidos biliares junto con GSH hacia el exterior del hepatocito (Rius et al., 2006; Rius et al., 2003). Además también transporta distintos fármacos como análogos de nucleótidos como la lamivudina, y antitumorales como el metotrexato, entre otros (Borst et al., 2000).

Mientras que MRP1 y MRP4, se distribuyen ampliamente en el organismo, MRP3 parece estar principalmente expresada en hígado, riñón e intestino (Borst et al., 1999).

Otros transportadores de esta subfamilia cuya expresión también se ha encontrado en hepatocitos son MRP6 (*ABCC6*), MRP7 (*ABCC10*) y MRP8 (*ABCC11*). MRP6 se ha caracterizado como un transportador basolateral y canalicular en hepatocitos de rata (Madon et al., 2000). Aunque se han encontrado niveles elevados del ARNm de MRP6 en hígado humano, su papel en el transporte de fármacos no está claro (Bergen et al., 2007). Parece que no está implicada en el transporte de productos de biotransformación de fase II como conjugados con ácido glucurónico, sulfato o glutatión, aunque tiene capacidad de transportar cisplatino, doxorubicina o etopósido (Belinsky et al., 2002). Menos conocidos son MRP7 y MRP8. El ARNm de MRP7 se ha encontrado en numerosos tejidos, incluyendo el hígado, y transporta algunos fármacos antitumorales como paclitaxel y vincristina (Hopper-Borge et al., 2004). El ARNm de MRP8 se ha detectado a bajos niveles en el hígado y entre sus sustratos se encuentran fármacos como el metotrexato y el fluorouracilo (Chen et al., 2005; Guo et al., 2003).

En cuanto a su estructura, los miembros de esta subfamilia se caracterizan por poseer dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a ATP, similar a la de otras ABCs. MRP1, 2, 3, 6 y 7 tienen además una región transmembrana adicional en el extremo N-terminal, con cuatro (MRP2) o cinco (MRP1, 3, 6 y 7) segmentos transmembrana.

▪ La subfamilia *ABCG*

Los miembros de esta familia son “half transporters”, que como ya se ha mencionado forman dímeros (homo o heterodímeros) mediante puentes disulfuro para dar lugar a un complejo de transporte funcional capaz de expulsar fuera de la célula una amplia variedad de sustratos utilizando la energía desprendida de la hidrólisis del ATP.

La mayoría de los miembros de esta subfamilia, como ABCG1, ABCG4, ABCG5 y ABCG8, son bombas exportadoras de colesterol (Kusuhara and Sugiyama, 2007). Los que presentan una mayor expresión en los hepatocitos son los transportadores ABCG5 y ABCG8, que forman un heterodímero localizado en la membrana canalicular (Berge et al., 2000), que promueve la excreción biliar de esteroides neutros (Wittenburg and Carey, 2002).

La proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP; gen *ABCG2*) es otro miembro de esta familia de transportadores, que presenta una especificidad de sustrato mucho más amplia que el resto, incluyendo una gran variedad de fármacos antitumorales. Desempeña un papel importante en la biodisponibilidad y eliminación hepática de fármacos y en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia antitumoral (Kusuhara

and Sugiyama, 2007). A diferencia del resto de “half transporters”, se localiza en la membrana plasmática y su distribución tisular es casi ubicua destacando su expresión en placenta, cerebro, riñón, hígado y colon (Allikmets et al., 1998).

Aunque BCRP puede formar homodímeros unidos por puentes disulfuro, parece que los niveles de monómeros y homodímeros de ABCG2 son bajos en la membrana canalicular de los hepatocitos. La principal unidad oligomérica de ABCG2 es un homotetrámero, aunque se han encontrado oligómeros mayores de hasta 12 unidades de ABCG2 (Xu et al., 2004).

Entre los compuestos endógenos que son sustratos de BCRP se encuentran varios esteroides, incluyendo probablemente ácidos biliares, con mayor eficacia para los derivados sulfatados, sobre todo ES y DHEAS (Imai et al., 2003; Janvilisri et al., 2005; Xu et al., 2004), y porfirinas (Krishnamurthy et al., 2004). Además, tiene capacidad para transportar múltiples fármacos antitumorales, como la mitoxantrona (Doyle et al., 1998), entre los que se encuentran varios sustratos de MRP1 y MRP2 (Suzuki et al., 2003).

Se han descrito varios polimorfismos en la proteína que afectan a la expresión, localización y actividad transportadora de la misma, alterando la farmacocinética y el espectro de resistencia a fármacos antitumorales (Tamura et al., 2007; Yanase et al., 2006).

▪ Otras proteínas exportadoras

En los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel del heterodímero OST α -OST β (de “Organic solute transporter α/β) en la circulación enterohepática de los ácidos biliares. Este heterodímero se localiza en la membrana basolateral de enterocitos y hepatocitos, además de en otros tejidos, y se encarga de expulsar al torrente sanguíneo ácidos biliares y otros esteroides sulfatados mediante un mecanismo de difusión facilitada (Ballatori, 2005; Ballatori et al., 2005; Dawson et al., 2005).

2.3. LA FUNCIÓN EXCRETORA DEL HIGADO FETAL

El feto posee desde temprana edad equipos enzimáticos de relativa madurez capaces de sintetizar ácidos biliares y pigmentos biliares (Colombo et al., 1985; Nakagawa and Setchell, 1990; Sun and Maines, 1990; Watanabe et al., 2003; Yamaguchi et al.,

1994), aunque la excreción biliar de estos compuestos por el hígado fetal es bastante deficiente.

Una de las causas probables, es la tardía expresión de las bombas canaliculares Mrp2 y Bsep en el hígado fetal (Macias et al., 2006; Serrano et al., 2003; Zinchuk et al., 2002). A pesar de ello, se han detectado pequeñas cantidades de ácidos biliares y pigmentos biliares en la vesícula biliar y meconio de fetos humanos obtenidos de abortos de más de 12 semanas de edad (Colombo et al., 1987; Yamaguchi and Nakajima, 1995).

El desarrollo de las vías de síntesis de ácidos biliares y pigmentos biliares precede a la maduración de los mecanismos implicados en la secreción biliar, por lo que los compuestos colefílicos fetales son regurgitados desde las células hepáticas hacia la sangre fetal, alcanzando niveles superiores a los que se encuentran en la sangre materna (Monte et al., 1995).

Aún no se conoce con exactitud cómo estos compuestos generados por el hígado fetal llegan a la sangre sinusoidal, aunque se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas, es que la bidireccionalidad de algunos OATPs (Briz et al., 2006; Li et al., 2000; Mahagita et al., 2007) hace de ellos unos buenos candidatos para llevar a cabo esta función. Apoyando esta idea, se ha detectado la expresión de diversas isoformas de estos transportadores en el hígado fetal (Macias et al., 2006; St-Pierre et al., 2004). Sin embargo, su abundancia en los hepatocitos fetales es mucho más baja que en adulto, excepto para Oatp4a1 (Fujiwara et al., 2001) y para su ortólogo humano OATP4A1 (Sato et al., 2003).

Otra posibilidad, es que los compuestos colefílicos salgan del hígado fetal a través de bombas ABC localizadas en la membrana basolateral de los hepatocitos, como la Mrp1 y la Mrp3, cuya expresión se encuentra más elevada en el hígado fetal que en el materno (Macias et al., 2006; St-Pierre et al., 2004).

2.3.1. Excreción de ácidos biliares por el hígado fetal

A pesar de que los ácidos biliares no son necesarios en la etapa fetal para participar en los procesos de digestión de grasas y vitaminas liposolubles, el hígado fetal es capaz de sintetizar y conjuguar ácidos biliares primarios a partir del colesterol, principalmente AC y QDC (Balistreri et al., 1992; Colombo et al., 1985; Nakagawa and Setchell, 1990),

En la sangre fetal se han identificado numerosos ácidos biliares, algunos de los cuales son inusuales en adultos (Back and Walter, 1980; Deleze et al., 1978; Kimura et al., 1989; Setchell et al., 1988; Shoda et al., 1988; Tohma et al., 1985). Lo más llamativo del "pool" de ácidos biliares fetales es la presencia de insaturaciones, junto a niveles

de hidroxilación mayores que en ácidos biliares de adultos, apareciendo ácidos biliares tetrahidroxilados. También existen peculiaridades en cuanto a la posición de los grupos hidroxilo. En el feto encontramos hidroxilaciones en C-1, C-4 y C-6 que no aparecen en adultos (Setchell et al., 1988), que convierten a estas moléculas en compuestos más hidrofílicos. Otra característica del “pool” de ácidos biliares fetales es la existencia de ácidos biliares planos debido a la presencia de insaturaciones en $\Delta 4$ y $\Delta 5$ o a la disposición en alfa del hidroxilo en C-5 (Setchell et al., 1988).

Aunque el feto carece de flora bacteriana intestinal, se han encontrado pequeñas cantidades de ácidos biliares secundarios, como el DC y el LC, junto con ácidos biliares terciarios, como el UDC, probablemente debido a la transferencia placentaria de estas moléculas desde la sangre materna al compartimento fetal (Monte et al., 1995).

La distinta composición del “pool” de ácidos biliares del feto y de la madre se ha explicado en términos de una selectiva transferencia transplacentaria de estos compuestos (Monte et al., 1995), junto con el distinto grado de maduración de la maquinaria enzimática relacionada con el metabolismo de los ácidos biliares (Balistreri et al., 1992).

Recientemente, se ha descrito el papel de los ácidos biliares como moléculas de señalización con funciones endocrinas y paracrinas (Keitel et al., 2008). Esto podría dar una respuesta fisiológica tanto para la síntesis temprana de ácidos biliares en el feto, como para la especial composición del “pool”.

Se ha observado que existe una relación entre la magnitud de la hipercolanemia materna y el aumento del riesgo de aborto y muerte perinatal (Glantz et al., 2004; Lammert et al., 2003). Además, se ha visto que la hipercolanemia materna puede afectar al normal desarrollo del feto, siendo el hígado el órgano más afectado (Macias et al., 2000).

2.3.2. Excreción de pigmentos biliares por el hígado fetal

Desde temprana edad, la actividad HO fetal produce BV y CO en el catabolismo de protoporfirina IX, sobre todo el isómero IX α (Galbraith, 1999; Ryter and Tyrrell, 2000). La BV es reducida por la acción de la BVR α a BR-X α (McCoubrey et al., 1995).

En el hígado adulto, la BR no conjugada es captada eficazmente por las proteínas OATP1B1 y OATP1B3 (Briz et al., 2003b; Cui et al., 2001). Una vez en el interior, la BR se dirige al retículo endoplasmático y es conjugada con ácido glucurónico por acción de la enzima uridín-difosfato-glucuronosil transferasa 1A1 (UDPG-transferasa 1A1) (Bosma et al., 1994) dando lugar a compuestos mono- y di-conjugados, más hidrosolubles, que reciben el nombre de BR directa I y II, respectivamente. A la BR sin

conjugar se le denomina BR indirecta. La secreción canalicular de glucurónidos de BR parece estar mediada por la proteína MRP2 (Jedlitschky et al., 1997). Cuando la excreción de BR a bilis está bloqueada, aumenta la expresión de MRP3 quien se encargará de expulsar la BR conjugada al plasma a través de la membrana plasmática de los hepatocitos (Keppler et al., 2000).

Las concentraciones de BR no conjugada en la sangre fetal son más elevadas que en el adulto sano (Knudsen and Lebech, 1989; Monte et al., 1995), debido a la elevada producción de BR fetal y a la baja actividad conjugante de la enzima UDPG-transferasa 1A1 presente en el hígado fetal (Kawade and Onishi, 1981; Kishi et al., 2008). La inmadurez del sistema de excreción hepatobiliar determina que esta vía de eliminación no sea relevante, encontrándose únicamente en la vesícula biliar fetal y en el meconio cantidades apreciables del isómero minoritario IX β de la BR (Aziz et al., 2001; McDonagh, 2001; Yamaguchi and Nakajima, 1995). Esto se debe probablemente a que es bastante más hidrosoluble que el isómero mayoritario IX α y no requiere glucuronidación para ser excretado a bilis (Blanckaert et al., 1977). A diferencia del isómero IX β , para la BR IX α la vía principal de excreción es la placenta (Blanckaert et al., 1977).

Durante muchos años la BV y la BR se habían considerado meros productos de desecho del metabolismo del grupo hemo, por lo que la transformación de BV, un producto inocuo y fácilmente excretable, en BR, una sustancia de baja hidrosolubilidad, neurotóxica, que forma cálculos biliares y que necesita ser metabolizada para su excreción, carecía de sentido fisiológico, siendo un paso enzimático inútil que suponía un gasto de energía adicional. Sin embargo, una de las ventajas evolutivas de la conversión de BV en BR podría ser la facilidad de ésta para difundir a través de las membranas placentarias debido a su mayor lipofilia y a la existencia de un gradiente de concentración desde el feto hacia la madre, evitando así la acumulación de los pigmentos hemoderivados en el feto (Knudsen and Lebech, 1989; Monte et al., 1995; Schmid, 1976). En la última década, diferentes estudios, “in vitro” e “in vivo”, han demostrado la capacidad de la BR para proteger a las células del daño producido por los radicales libres (Dore et al., 1999a; Dore and Snyder, 1999; Galbraith, 1999). Un estudio reciente llevado a cabo en nuestro grupo de investigación, ha puesto de manifiesto el efecto antioxidante de la BR sobre la placenta y el feto en situaciones de estrés oxidativo producido en colestasis gestacional (Perez et al., 2008). No obstante, en tejidos como el sistema nervioso central, altas concentraciones de BR pueden provocar daño irreversible e incluso muerte. Esto es especialmente importante en los fetos debido a la elevada sensibilidad de su sistema nervioso central en pleno desarrollo, manifestada por encefalopatía y kernicterus (Gourley, 1997). Así pues, la acumulación de BR, dentro de unos valores fisiológicos, tendría un papel fisiológico beneficioso (Sedlak and Snyder, 2004).

En resumen, durante la vida intrauterina se sintetizan cantidades elevadas de compuestos colefílicos, pero, como ya se ha mencionado, debido a la inmadurez del hígado fetal, es la placenta quien asume un papel excretor similar al que desempeña el sistema hepatobiliar en el adulto, mediado también en la placenta por transportadores OATP y proteínas ABC que, en conjunto confieren al proceso de transferencia placentaria características de vectorialidad feto-materna. Por ello también juegan un papel protector en la barrera placentaria reduciendo el flujo de sustancias nocivas desde la madre al feto (Marin et al., 2004).

2.4. LA PLACENTA

2.4.1. Anatomía y Fisiología de la placenta

La gestación es un estado activo y dinámico. En los primeros dos tercios de la misma, el objetivo principal del desarrollo embrionario es la organogénesis. En el último tercio de la gestación, se observa un rápido crecimiento fetal gracias a cambios en el metabolismo materno que permiten una mayor transferencia de nutrientes (Serrano, 2008).

La placenta establece una estrecha relación entre el feto y su madre y desempeña un papel clave en la vida intrauterina atendiendo a las necesidades de respiración y nutrición del feto (Baticón, 1999). Además, procesa señales enviadas desde ambos compartimentos para regular la demanda fetal y el suministro materno de sustratos, asegura sus propias demandas metabólicas y transfiere sustancias de desecho fetal a la circulación materna (von Versen-Hoeynck and Powers, 2007).

La placenta humana a término es un órgano plano, redondeado u oval, de 15 a 20 cm de diámetro y de 2 a 3 cm de espesor en su parte más ancha, que llega a tener un peso de aproximadamente una sexta parte del peso fetal.

La implantación y la formación de la placenta son procesos altamente coordinados que implican interacciones entre las células maternas y embrionarias (Serrano, 2008). La placenta comienza su desarrollo aproximadamente al final de la primera semana de gestación, cuando el blastocisto comienza a rodearse de múltiples capas de células epiteliales primordiales, el citotrofoblasto. Durante el primer trimestre, el rápido crecimiento de la placenta está dirigido principalmente por la multiplicación del citotrofoblasto el cual predomina en este estadio del desarrollo. A medida que el citotrofoblasto pierde su actividad mitótica, se fusiona para formar el sincitiotrofoblasto, polinucleado y altamente polarizado, y el trofoblasto de unión que media la invasión de las vellosidades coriónicas en la decidua materna. La invasión del trofoblasto en el epitelio uterino y el remodelado de las arterias espirales es lo que asegura que la

unidad fetoplacentaria en desarrollo perciba el suficiente suministro sanguíneo y que exista un transporte de nutrientes y gases eficiente y una eliminación de las sustancias de desecho (von Versen-Hoeynck and Powers, 2007).

Las vellosidades coriónicas son las unidades funcionales de la placenta (figura 5). Están constituidas por una estructura ramificada con una parte central de tejido conectivo o mesénquima que contiene macrófagos fetales o células de Hofbauer y que está fuertemente irrigada por capilares fetales (Kaufmann et al., 1985). El tejido que rodea las vellosidades y que está en contacto directo con la sangre materna es el trofoblasto. Aunque sólo es un 13% de toda la placenta (aproximadamente 60 g) (Munro, 1980), juega importantes funciones en varios aspectos de la fisiología placentaria, como se comentará más adelante. Todas estas estructuras están rodeadas por los vasos sanguíneos maternos.

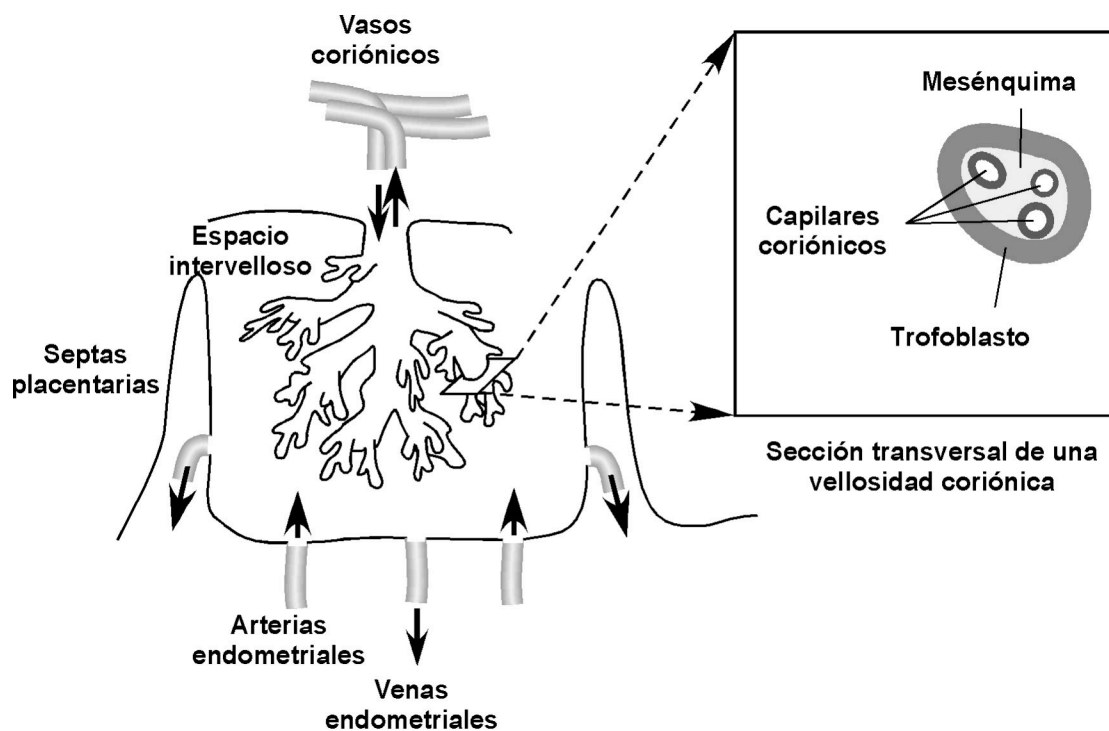


Figura 5. Dibujo esquemático de la estructura una vellosidad coriónica. Las flechas indican la dirección del flujo de sangre materna y fetal.

Cuando se observa un corte de placenta humana en el 2º trimestre de la gestación al microscopio, se distinguen en las vellosidades coriónicas dos capas celulares en el trofoblasto (figura 6): una exterior o sincitiotrofoblasto y una interior o citotrofoblasto. En la placenta humana a término (figura 6), el citotrofoblasto prácticamente ha desaparecido (Luckett, 1975; Moll, 1985) y se aprecia como la abundancia de la red capilar aumenta a medida que avanza la gestación (Kaufmann et al., 1985).

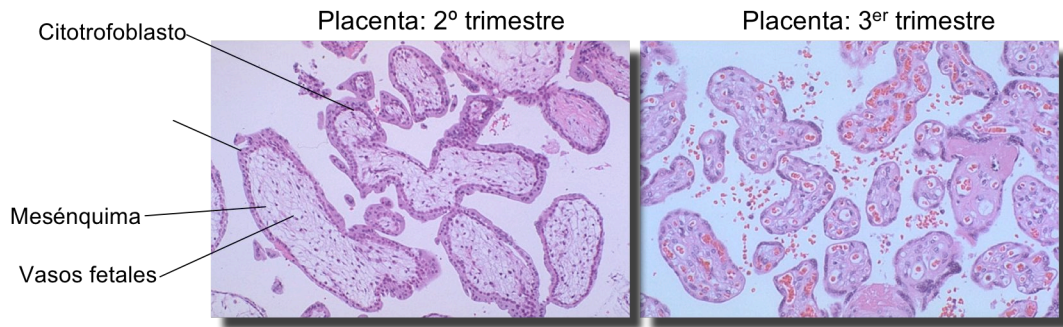


Figura 6. Tinción de hematoxilina-eosina de un corte de placenta humana al final del 2º trimestre y a término (3º trimestre), en el que se observan cortes de vellosidades coriónicas inmersas en las lagunas maternas y la disposición de las capas de trofoblasto y vasos fetales.

La mayor parte de la transferencia de nutrientes entre la madre y el feto ocurre a través de una única capa de células, el sincitiotrofoblasto. Los nutrientes alcanzan el feto a partir de la sangre materna que está en contacto directo con las microrvellosidades o borde en cepillo presentes en la membrana apical del sincitiotrofoblasto. Posteriormente cruzan la membrana basolateral de dicha capa celular que está adyacente al endotelio de los capilares fetales (Serrano, 2008).

Es importante destacar del sincitiotrofoblasto su alta tasa de síntesis y secreción, que concuerda con la abundancia de ribosomas unidos al retículo endoplasmático, mientras que su capacidad de absorción se manifiesta por la presencia de las microvellosidades. En algunos puntos estas microvellosidades desaparecen. Algunos autores sugieren que estas zonas lisas de la membrana son lugares clave en el intercambio de líquidos entre ambos compartimentos (Behrman RE, 1992). En contraste, las células del citotrofoblasto constituyen estructuras bien definidas, con un citoplasma rico en ribosomas, de los cuales pocos están unidos al retículo endoplasmático, lo que sugiere una escasa capacidad secretora (Munro, 1980).

Al examinar las placentas a término de un gran número de especies, se observa una estrecha relación entre el peso de la placenta y del neonato están. En algunos animales, incluyendo en la especie humana, el peso placentario aumenta progresivamente a lo largo de la gestación (Serrano, 2008).

En varias especies el área de la superficie de intercambio placentario aumenta de 5 a 15 veces a partir de la mitad de la gestación, incluso cuando no se producen cambios en el peso placentario (Coan et al., 2004; Roberts et al., 2001). En placentas hemocoriales, donde el trofoblasto está en contacto directo con la sangre materna como

es el caso de los primates, los roedores y los lagomorfos, la capacidad teórica de difusión aumenta entre 15 y 20 veces (Coan et al., 2004).

Otra característica que hace de la placenta un órgano esencial durante la gestación es que permite la autonomía circulatoria del feto y mantiene una barrera inmunológica feto-materna (Baticón, 1999).

2.4.2. Circulación placentaria

Las vellosidades coriónicas carecen de vasos sanguíneos durante las primeras dos a tres semanas de gestación, momento en el cual el embrión no posee aún un sistema circulatorio. Hacia el final de la tercera semana se forman islotes sanguíneos, que pronto se rodean de paredes vasculares primitivas, y tras ramificarse, dan lugar a la vascularización del corion. Al mismo tiempo se desarrollan el corazón y el sistema circulatorio fetal. Al final de la cuarta semana se establecen conexiones entre los vasos del corion y los del feto, formándose así un sistema circulatorio feto-placentario.

Por su parte, el flujo materno no se establece hasta las semanas 10 y 12 de la gestación (Burton and Jauniaux, 2004; Jauniaux et al., 2000). Durante el primer trimestre, antes del inicio de la llegada de sangre al espacio intervelloso, la nutrición fetal es hitiotrófica, con procesos de fagocitosis de secreciones glandulares endometriales por parte del trofoblasto (Burton and Jauniaux, 2001; Burton et al., 2002). Después de las semanas 10-12 de gestación la sangre materna ya está en contacto con las vellosidades y tanto la transferencia de nutrientes y gases como la eliminación de productos de desecho se llevan a cabo a través de las membranas placentarias.

En los primates la sangre materna se canaliza al útero por las arterias uterinas y arterias espirales desde donde surgen las arterias tortuosas. A través de los orificios de la placa basal de la placenta la sangre alcanza el espacio intervelloso. La presión de la sangre que entra tiende a rechazar a la sangre ya presente hacia la placa basal, desde donde se escapa por las numerosas comunicaciones existentes entre el espacio intervelloso y las dilatadas venas de la decidua basal, para recogerse finalmente en su mayor parte por el seno marginal. El resto de la sangre venosa materna es drenada por las venas uterinas situadas en la decidua basal, cuyas ramas se sitúan en las septas deciduales que separan la placenta en lóbulos denominados cotiledones.

La sangre fetal llega a la placenta proveniente del feto por las arterias umbilicales, que constituyen una prolongación de las arterias hipogástricas fetales. En la unión de la placenta con el cordón umbilical las arterias umbilicales se dividen de forma radial en las arterias placentarias, que se ramifican en la placa coriónica (Beaconsfield et al.,

1980). La sangre que retorna al feto desde la placenta es recogida por la vena umbilical, que desemboca en el conducto venoso y de allí pasa a la vena cava inferior.

La eficacia del intercambio placentario guarda relación con la distribución de la sangre que circula por los vasos uterinos y umbilicales. En humanos el flujo sanguíneo uterino a término se ha calculado entre 400 y 700 ml/min.

A lo largo de la gestación se produce un aumento progresivo del flujo sanguíneo al *conceptus*. La dilatación de los sinusoides presentes en las vellosidades aumenta durante el desarrollo placentario, que determina una disminución de la resistencia vascular y, por tanto, un aumento del flujo sanguíneo a igual presión de perfusión (Kaufmann et al., 1985).

No todas las placentas presentan una distribución circulatoria como la descrita. La placenta de rata, por ejemplo, no tiene una estructura en vellosidades coriónicas, sino que presenta una circulación laberíntica. En cada lóbulo de la placenta laberíntica una rama de las arterias uterinas proporciona sangre a la parte central del laberinto, desde donde fluye hacia la periferia. Desde allí es drenada por las venas maternas. Los vasos fetales llegan en paralelo hasta el fondo del lóbulo para recogerse en dirección opuesta mediante una red paralela fuertemente anastomosada.

En las especies con parto múltiple (roedores, lagomorfos, etc.), la existencia de numerosos fetos en ambos cuernos uterinos obliga a una distribución en paralelo de las derivaciones arteriales y venosas del útero. La irrigación de ambos cuernos es independiente y con clara simetría bilateral. En la rata, el flujo sanguíneo que irriga el útero grávido proviene principalmente de las arterias uterinas y escasamente de la anastomosis de éstas con las arterias ováricas. Utilizando microesferas radiactivas al final de la gestación de ratas preñadas se ha valorado el flujo sanguíneo al útero en 13.2 ml/min. De este flujo aproximadamente el 16% irriga el endometrio y el miometrio, el 84% restante nutre a las placentas. Así pues, en el día 21 de la gestación, el flujo sanguíneo materno por placenta es ≈ 1 ml/min (0.76-1.09 ml/min) (Rosso, 1980).

Generalmente, se ha aceptado que el flujo de sangre en el útero materno se distribuye uniformemente a los distintos lugares de implantación placentaria. Sin embargo, en el conejo y en la rata se ha observado que los fetos proximales del cuerno uterino son de mayor tamaño.

2.4.3. Niveles de protección de la barrera placentaria

Muchos fármacos y algunos compuestos potencialmente tóxicos, tanto de origen endógeno (ácidos biliares, BR, etc) como xenobióticos, que pueden encontrarse en la sangre materna a concentraciones relativamente altas sin comprometer la vida de la madre, podrían ocasionar un daño severo en el feto si alcanzasen esos niveles en el

compartimento fetal, debido a la mayor sensibilidad de sus tejidos en crecimiento y a la menor capacidad de sus sistemas de detoxificación y excreción (Gourley, 1997).

Afortunadamente, la placenta constituye una barrera que controla el paso hacia la sangre fetal de estos compuestos, pero además es capaz de bombear desde el compartimento fetal hacia la sangre materna las sustancias que, procedentes de la madre, han podido atravesarla o que se han producido en el feto debido a su propio metabolismo.

Como ya se ha mencionado, a medida que el embarazo progresa, la placenta adapta sus características funcionales y estructurales al incremento de las demandas del feto. Hay que tener en cuenta que la placenta es un órgano en continua evolución y que la permeabilidad de la barrera y los parámetros farmacocinéticos de los fármacos varían con la edad gestacional. En este sentido, el primer trimestre de gestación es el más crítico en la exposición del feto a sustancias nocivas. Un buen ejemplo de ello es que más del 20% de los recién nacidos de madres tratadas con citotóxicos durante el primer trimestre del embarazo sufren malformaciones (Reynoso et al., 1987).

Las estructuras histológicas responsables del papel de la placenta como barrera de protección son: 1) las membranas apical y basal del trofoblasto, 2) el tejido del estroma, 3) el endotelio de los capilares fetales y 4) su membrana basal. Estas estructuras proporcionan una barrera física y mecanismos específicos para desarrollar una protección a tres niveles (figura 7) (Marin et al., 2004):

- 1^{er} nivel: Restricción de la entrada de sustancias y mecanismos de expulsión en la membrana del trofoblasto.
- 2º nivel: Biotransformación de moléculas en los tejidos placentarios.
- 3^{er} nivel: Restricción de la entrada de sustancias y mecanismos de expulsión en la membrana del endotelio capilar de las vellosidades coriónicas.

Aunque esta última función no se ha tenido en cuenta tradicionalmente, estudios de la presencia de transportadores específicos (Dye et al., 2001) y bombas exportadoras (Patel et al., 2003; St-Pierre et al., 2000) en el endotelio de las vellosidades parece desafiar la idea de que estas células solamente participarían en menor medida en el intercambio restrictivo entre la madre y el feto.

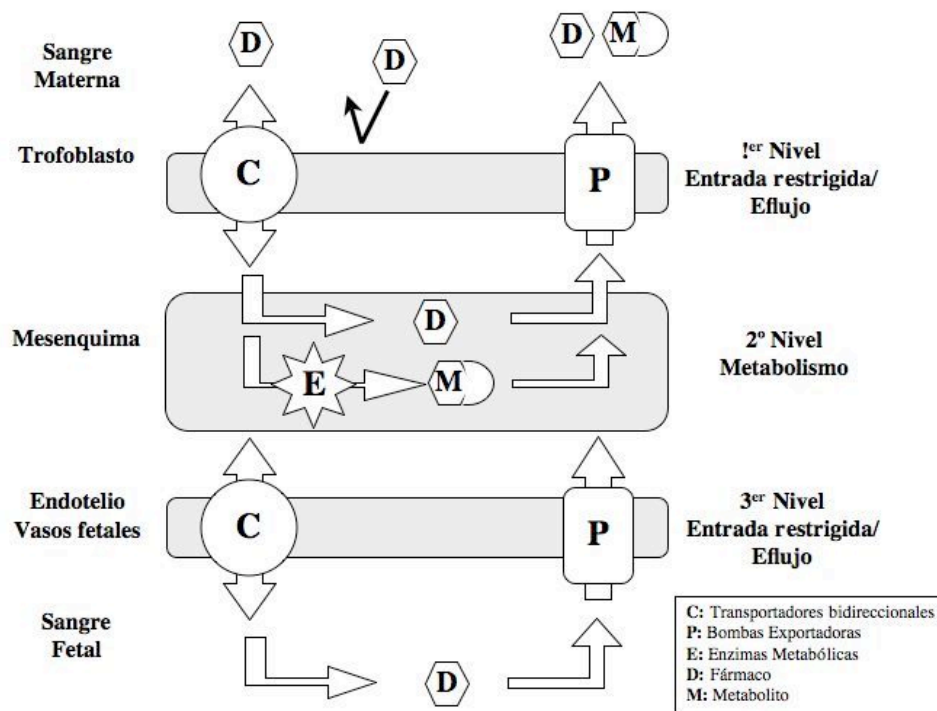


Figura 7. Niveles de protección de la barrera placentaria para fármacos.

2.4.4. El papel de la placenta en la excreción de compuestos colefilicos fetales

A diferencia de lo que ocurre en el adulto donde el sistema hepatobiliar en colaboración con el sistema renal son los responsables de la biotransformación y eliminación de ácidos biliares, pigmentos biliares y otros compuestos de deshecho, durante la vida intrauterina la principal ruta de eliminación de los productos del metabolismo fetal es la transferencia placentaria de los mismos hacia la sangre materna. Una vez en la sangre materna, el principal responsable de su detoxificación es el hígado materno aunque también hay una pequeña contribución del riñón que participa en la eliminación de las especies sulfatadas y glucuronidadas (Frohling and Stiehl, 1976).

En esta función excretora de tipo hepatobiliar de la placenta, también participan transportadores OATP y proteínas ABC (figura 8), que en conjunto confieren al proceso de transferencia placentaria características de vectorialidad feto-maternas.

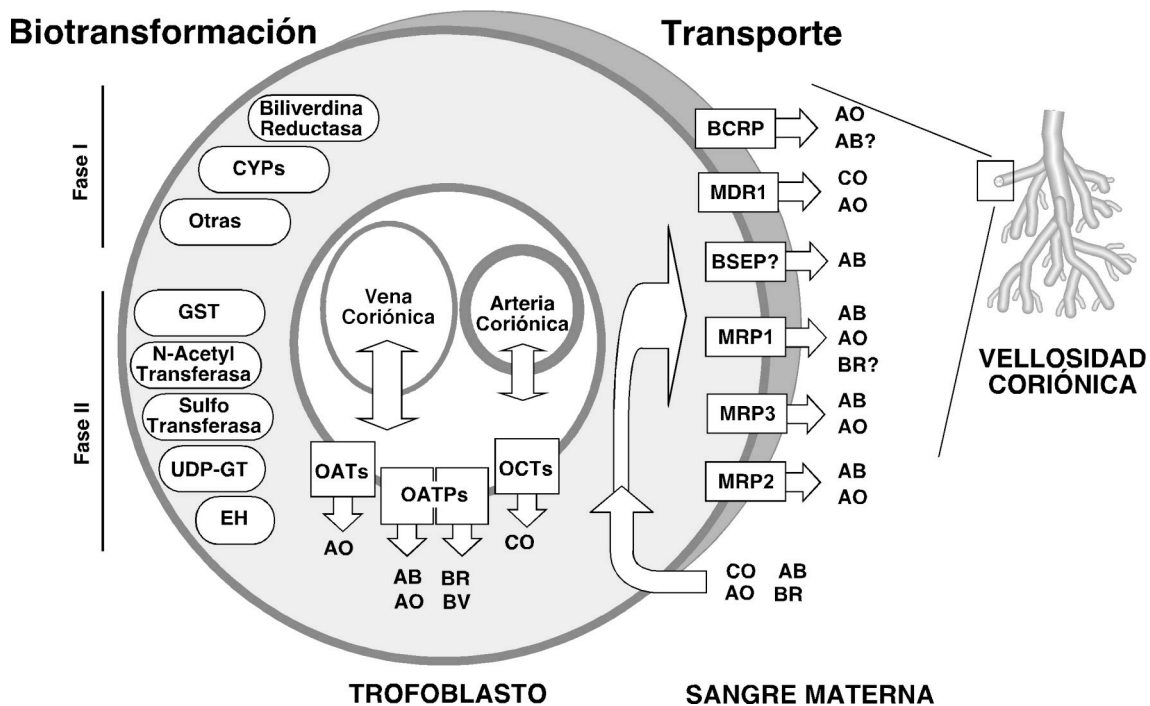


Figura 8. Representación esquemática de transportadores de ácidos biliares y pigmentos biliares en el trofoblasto. También se indican las principales enzimas responsables de los procesos de biotransformación de la barrera placentaria.

▪ Excreción de ácidos biliares fetales por la placenta

Durante mucho tiempo se había aceptado que la transferencia placentaria de los ácidos biliares se llevaba a cabo por difusión simple dada su naturaleza lipídica y la existencia de un gradiente desde el feto a la madre. Sin embargo, a pH fisiológico, los ácidos biliares se encuentran en forma de aniones con escasa capacidad para atravesar las membranas celulares (Cabral et al., 1987).

Por otra parte un sistema de difusión simple permitiría el paso de compuestos en ambas direcciones, reduciendo la eficacia del proceso excretor. Sin embargo, la transferencia desde la madre al feto es mínima.

En los últimos años, diversos trabajos han puesto de manifiesto la presencia de un transporte mediado de aniones orgánicos colefilicos en ambos polos del trofoblasto humano y de rata (Marin et al., 2003).

Las primeras evidencias de la existencia de un proceso de transporte placentario de ácidos biliares mediado por proteínas de membrana se obtuvieron en estudios funcionales llevados a cabo en vesículas de membrana basal de trofoblasto humano y de rata (Marin et al., 1990; Serrano et al., 2003). Estos estudios indicaron que la

captación de ácidos biliares desde la sangre fetal se realiza mediante un mecanismo de intercambio aniónico con bicarbonato (el-Mir et al., 1991). Por otra parte, este sistema presenta distinta eficacia de transporte para los diferentes ácidos biliares (Serrano et al., 1993) y además, también participa en la eliminación de otros aniones orgánicos del compartimento fetal (Bravo et al., 1993). Todo ello sugiere la participación de miembros de la familia OATP en la captación por el trofoblasto de ácidos biliares, y otros aniones orgánicos, desde la sangre fetal.

En la última década, se ha detectado la expresión, a nivel de ARNm, de varias isoformas de OATPs en la placenta humana (OATP1A2, OATP2B1, OATP1B1, OATP1B3 y OATP4A1) (Briz et al., 2003b; Sato et al., 2003; St-Pierre et al., 2002). Salvo, OATP2B1 y OATP4A1, en la placenta humana, cuyos niveles están elevados a término, el resto de isoformas tiene niveles muy bajos al final de la gestación (Lammert et al., 2003; Sato et al., 2003; St-Pierre et al., 2004).

Por su parte, estudios similares realizados en vesículas de membrana apical de trofoblasto humano y de rata (Bravo et al., 1995; Marin et al., 1995) revelan que la salida de los ácidos biliares hacia la sangre materna se lleva a cabo según un mecanismo que requiere de la hidrólisis de ATP, apuntando hacia la posible implicación de distintas proteínas ABC. Dentro de las proteínas ABC con capacidad para transportar ácidos biliares, MDR1 y algunas MRPs (MRP1, MRP2 y MRP3) son las candidatas más probables ya que se ha demostrado su presencia en la cara apical del trofoblasto humano (St-Pierre et al., 2000), así como en la placenta de rata (Serrano et al., 2003). Sin embargo, el principal sistema a cargo de la excreción de ácidos biliares a la bilis, la BSEP, se ha detectado a niveles muy bajos tanto en placentas humana y de rata a término (Patel et al., 2003; St-Pierre et al., 2004). Aunque sus niveles durante el primer trimestre de la gestación están más elevados (Patel et al., 2003). Es interesante reseñar que la expresión de estas bombas ABC aumenta considerablemente tras la exposición de la placenta a niveles elevados de ácidos biliares en la sangre materna (Serrano et al., 2003).

Existe cierta controversia sobre la localización celular de algunas de estas proteínas en la placenta. Por inmunofluorescencia y western blot, tanto MRP1, MRP2 como MRP3 se han detectado en la membrana apical del sincitiotrofoblasto (St-Pierre et al., 2000), y además, MRP1 también se ha localizado en los vasos fetales y en la membrana basal del sincitiotrofoblasto (Nagashige et al., 2003; St-Pierre et al., 2000).

Otro miembro importante de la familia ABC es la BCRP, también conocida como ABCP de “ABC placental protein” debido a su elevada expresión en este órgano (Allikmets et al., 1998). Esta proteína se ha detectado en la membrana apical del trofoblasto y en los vasos fetales (Ceckova et al., 2006). Se ha visto que la expresión de Bcrp1 en la placenta de roedores es máxima hacia la mitad de la gestación y va disminuyendo a término (Kalabis et al., 2007).

▪ Excreción de pigmentos biliares fetales por la placenta

Los vasos coriónicos del endotelio y el sincitiotrofoblasto están expuestos a altas concentraciones de hemoglobina a través de su contacto directo con la sangre fetal y materna, respectivamente. En la placenta están expresadas las isoformas HO-1 y HO-2, aunque los niveles de ARNm de la isoforma 2 son más elevados que los de HO-1. Por otra parte, la expresión de ambas isoenzimas se ve aumentada en las últimas etapas de la gestación (McLaughlin et al., 2003; McLean et al., 2000; Yoshiki et al., 2000).

Como ya se ha mencionado, la BV producida por la actividad HO, es biotransformada a BR por la enzima BVR α presente en la placenta y otros tejidos (McDonagh et al., 1981). En los últimos años, se ha demostrado que la BR, a concentraciones tan bajas como 10 nM, es capaz de proteger tanto a células cerebrales como a células HeLa (de adenocarcinoma de cervix humano) frente a la toxicidad ocasionada por una concentración casi 10.000 veces superior de H₂O₂ (Baranano et al., 2002; Dore and Snyder, 1999). Se ha sugerido que este potente efecto podría explicarse en base a la capacidad de reciclaje de la BR, ya que ésta en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) se oxida a BV. Posteriormente, la BV es de nuevo transformada a BR por acción de la enzima BVR α , estableciéndose así un ciclo redox que permitiría amplificar unas 10.000 veces los efectos antioxidantes de la BR, sin necesidad de que ésta se encuentre presente en los tejidos en elevadas concentraciones, ya que podría resultar tóxica (Baranano et al., 2002; Stocker et al., 1987).

Otro efecto antioxidante que ejerce la BR es prevenir la peroxinitración de proteínas mediante la inhibición de la producción del radical superóxido ya que bloquea la activación de la enzima NADPH oxidasa (Foresti et al., 1999; Kwak et al., 1991).

La BR también tiene propiedades antioxidantes de manera indirecta ya que aumenta la expresión de diversos elementos del sistema de defensa antioxidante como la BCR α , y los transportadores de vitamina C, SVCT1 y SVCT2, así como también varios receptores nucleares sensibles a la activación por compuestos biliares, en situaciones de toxicidad inducida por la colestasis gestacional (Perez et al., 2007).

Sin embargo, las propiedades antioxidantes de la BR están limitadas a bajas concentraciones ya que elevados niveles de este pigmento pueden causar daño irreversible o incluso la muerte cuando se acumula en el sistema nervioso (Gourley, 1997).

La función que desempeña la placenta transfiriendo productos del metabolismo fetal a al sangre materna es especialmente importante para la BR no conjugada. Esto es debido a la sensibilidad del sistema nervioso fetal a la toxicidad de este pigmento (Amit and Brenner, 1993; Notter et al., 1986). Tanto en el feto como en el recién nacido, la BR se produce en mayor cantidad que en el adulto debido a la menor vida media de los eritrocitos fetales. Sin embargo, se mantiene en niveles que nos son

tóxicos, porque es eliminada por la placenta. Una vez desconectado de la placenta, durante la primera semana de vida extrauterina, en el neonato se puede producir la hiperbilirrubinemia fisiológica del recién nacido, debido a su función hepática aún inmadura y al marcado incremento de la formación de BR no conjugada por la hemólisis después del nacimiento (Bervoets et al., 1994).

Siempre se ha considerado que la difusión simple a través de la placenta era el principal mecanismo responsable de la eliminación de la BR fetal (Schmid, 1976), debido a la lipofilia de la molécula (Ostrow et al., 1994) y a la existencia de un gradiente de concentración a través de la placenta desde el feto hacia la madre (Monte et al., 1995). Un mecanismo difusional similar ha sido sugerido para la transferencia placentaria de los ácidos biliares sintetizados por el feto, cuyos niveles son también más altos en la sangre fetal que en la materna. Pero como se comentó en el apartado anterior, recientes estudios han revelado la existencia de un transporte mediado a través de las dos caras del trofoblasto humano.

Estudios recientes realizados con vesículas de membrana plasmática apical y basal de trofoblasto humano, sugieren que, bajo circunstancias fisiológicas, la difusión simple no es la vía mayoritaria de transferencia placentaria de BR no conjugada, sino que existen claras evidencias de la implicación de sistemas de transporte en ambos polos de la membrana plasmática del trofoblasto (Serrano et al., 2002). En experimentos realizados usando el modelo experimental de placenta de rata perfundida in situ, se ha encontrado que la transferencia placentaria de BR no conjugada es inhibible por varios aniones orgánicos colefilicos (Briz et al., 2003a). Este modelo experimental ha permitido obtener resultados que indican que la BR no conjugada no es biotransformada durante su tránsito transplacentario. Los resultados obtenidos en placenta de rata apoyan un sistema mayoritariamente no difusional para la transferencia placentaria de BR no conjugada e indican que los mecanismos implicados tienen características vectoriales en dirección feto a madre (Briz et al., 2003a). Como apoyo de esta hipótesis, se encuentra el hecho de que en ratas gestantes con colestasis e hiperbilirrubinemia, los niveles de BR no conjugada en el suero fetal están muy levemente afectados (Macias et al., 2000).

El mecanismo por el que la placenta capta los pigmentos biliares no está aún completamente esclarecido. Varios miembros de la familia de transportadores OATP, como el OATP1B1 y el OATP1B3, tienen capacidad para captar BR no conjugada como se ha demostrado en estudios funcionales realizados en oocitos de rana *Xenopus laevis* (Briz et al., 2003b).

En el interior de los trofocitos, la BR está parcialmente unida a lípidos y a proteínas como la glutatión S-transferasa (Vander Jagt et al., 1981).

En cuanto al transporte a través de la membrana apical del trofoblasto, la BR podría ser exportada vía un mecanismo dependiente de ATP (Serrano et al., 2002). Aún no se conoce si una o varias de las isoformas de MRPs que se han detectado en la placenta

humana (St-Pierre et al., 2000) y de rata (El-Mir et al., 1997; Serrano et al., 2003), están involucradas en este papel. En principio el principal candidato para llevar a cabo esta función era Se sabe que MRP2, dada su localización apical en el sincitiotrofoblasto (Meyer et al., 2005; St-Pierre et al., 2000) y su capacidad para transportar BR conjugada (Jedlitschky et al., 1997). Sin embargo, debido a la baja actividad de la UDPG-transferasa del hígado fetal (Kawade et al., 1981; Kishi et al., 2008) y que durante su paso por la placenta la BR no sufre ninguna biotransformación (Briz et al., 2003a), se ha descartado esta bomba como el principal mecanismo de excreción de la BR no conjugada. Por lo que el transporte a través de esta membrana aún no se ha esclarecido.

2.4.5. Mecanismos de protección de la barrera placentaria frente a fármacos y toxinas

La exposición del feto a moléculas exógenas depende de la capacidad de la madre para eliminar dichos compuestos y de la capacidad de la placenta para transportarlos de nuevo a la madre. Puesto que la placenta es que es un órgano en continuo desarrollo, los cambios que se producen en ella deben ser compatibles con el mantenimiento de su parcial permeabilidad necesaria para proteger al feto de la exposición a sustancias dañinas presentes en la sangre materna (Ganapathy et al., 2000b; Marin et al., 2003).

Aunque muchos fármacos administrados a la madre durante la gestación pueden atravesar la placenta otros, dependiendo de su tamaño y estructura, no pueden hacerlo. La difusión a través de la placenta de ciertos fármacos cuya masa molecular es mayor de 500 Da, es generalmente escasa (Stulc, 1997). La liposolubilidad, el grado de ionización e incluso el pKa, son determinantes para difundir a través de la placenta. Así, algunas penicilinas, ácidos fuertes, pueden atravesar la placenta por difusión simple (Pacifici, 2006). Varios fármacos que son bases débiles, como el acetaminofeno (APAP), el pentobarbital, la fenitoina y la clonidina, probablemente también atraviesan la placenta por este mecanismo (Pacifici and Nottoli, 1995). Muchos de los análogos de nucleótidos inhibidores de la transcriptasa reversa, difunden por la placenta y se han detectado en el fluido amniótico (Chappuy et al., 2004).

▪ Entrada mediada por transportadores

Aunque la mayor parte de los transportadores existentes en la membrana celular del trofoblasto tienen sustratos fisiológicos específicos, algunos de ellos también pueden transportar xenobióticos de estructura similar a los compuestos endógenos (Leazer and Klaassen, 2003). Esto va a permitir que la placenta suponga una barrera para

algunos compuestos (como pueden ser fármacos y toxinas), mientras que para otros sea una puerta de entrada (fármacos dirigidos al feto). Así que un mayor conocimiento de estos sistemas de transporte es esencial para evaluar distintos aspectos farmacológicos y toxicológicos de la barrera placentaria.

En la membrana apical del trofoblasto están expresadas varias isoformas de la familia de transportadores de monocarboxilatos (MCTs, “Monocarboxylate Transporter family”, familia de genes *SLC16A*) responsables de expulsar el lactato, piruvato y β -D-hidroxibutirato hacia la sangre materna (Halestrap and Meredith, 2004). Son transportadores independientes de sodio y parece que posiblemente el mecanismo de transporte sea un co-transporte de ácidos monocarboxílicos y un protón (Halestrap and Price, 1999). La especificidad de estos transportadores no es restrictiva a sus sustratos fisiológicos. Se ha descrito el transporte de valproato a través de un sistema de transporte de monocarboxilato acoplado a protón en la membrana apical del sincitiotrofoblasto (Ushigome et al., 2001). Otros fármacos transportados por estas proteínas son el benzoato, salicilatos, estatinas, nateglinida y foscarnet (Ganapathy and Prasad, 2005; Halestrap and Meredith, 2004).

Debido a su esencial papel en las terapias antivirales y antitumorales basadas en la acción de fármacos análogos de nucleósidos, un grupo de transportadores de especial interés son los transportadores de nucleósidos (ENTs, “Equilibrative nucleoside transporters”). Estos transportadores están ampliamente distribuidos y presentan una gran gama de sustratos. Se ha descrito la presencia de dos isoformas en la placenta humana: ENT1 (gen *SLC29A1*) y ENT2 (gen *SLC29A2*) (Barros et al., 1995; Griffiths et al., 1997b). El primero, que está muy expresado en el trofoblasto humano, está localizado en la cara materna de este epitelio. También hay evidencias de la presencia de otra familia de transportadores de nucleósidos denominada “Concentrative nucleoside transporters” (CNTs). De esta familia se encuentran en la placenta humana las isoformas CNT2 (gen *SLC28A2*) y CNT3 (gen *SLC28A3*). Tanto ENT1 como ENT2 transportan una gran variedad de agentes terapéuticos como fármacos antitumorales (citarabina y gemcitabina) y antivirales (zalcitabina y zidovudina) (Griffiths et al., 1997a; Griffiths et al., 1997b), por lo que probablemente desempeñan un papel clave en la exposición del feto a este tipo de fármacos.

El transporte de aminoácidos a través de la placenta juega un importante papel en la regulación del crecimiento fetal. El sistema utilizado para atravesar la barrera placentaria es un transporte activo secundario, siendo la captación de aminoácidos por la placenta cuatro veces superior a la del hígado materno por unidad de peso. En la placenta humana se han identificado 17 sistemas de transporte de aminoácidos (Cleal and Lewis, 2008; Grillo et al., 2008). La interacción de xenobióticos con los sistemas de transporte de aminoácidos en el sincitiotrofoblasto puede dar lugar a un déficit en el paso de estos aminoácidos hacia el feto. Por ejemplo, la nicotina es capaz de acumularse en los tejidos placentarios y en el líquido amniótico dando lugar a un descenso en la captación de aminoácidos por la placenta que puede causar efectos

adversos en el desarrollo fetal (Pastrakuljic et al., 1999). Otro agente que interacciona con estos sistemas de transporte es la cocaína (Pastrakuljic et al., 1999).

Por otro lado, también se ha descrito la interacción de la cocaína con transportadores de monoaminas, afectando al transporte de serotonina y noradrenalina a través de la membrana apical del trofoblasto (Pastrakuljic et al., 1999). Otros inhibidores del transporte de monoaminas, aunque no son sustratos, son algunos antidepresivos. Sin embargo, las anfetaminas si que son sustratos de estos transportadores por lo que su consumo durante la gestación expondría al feto a dichos tóxicos (Ganapathy et al., 1999).

Como ya se ha mencionado, en la placenta están expresadas varias isoformas de OATPs (Briz et al., 2003b; St-Pierre et al., 2002). Estos transportadores son capaces de transportar una amplia gama de sustratos entre los que se encuentran muchos xenobióticos (Hagenbuch and Gui, 2008). Esto sugiere que estas isoformas podrían servir como ruta para transferir fármacos tanto aniónicos como cationicos a través de la placenta.

Algunos miembros de la subfamilia de transportadores SLC22A (OCT) también podrían ser responsables de la entrada de numerosas sustancias catiónicas en el trofoblasto. Alguno de estos transportadores, como el OCT3, es muy abundante en la placenta humana (Kekuda et al., 1998; Sata et al., 2005). Los sustratos fisiológicos de OCT3 son las aminas biógenas: serotonina, dopamina, norepinefrina e histamina, aunque también es capaz de transportar distintos xenobióticos como anfetaminas, la neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridinio y los antidepresivos imipramina y desipramina. Dentro de esta subfamilia se encuentran los transportadores de carnitina dependientes de sodio (OCTN). Algunos de éstos se han encontrado en placenta humana y de rata. En particular, las isoformas OCTN1 y OCTN2 han sido detectadas en tejido placentario humano (Grube et al., 2005). OCTN2 parece ocuparse del transporte placentario de numerosos fármacos como tetraetilamonio, quinidina, verapamilo, varios antibióticos β -lactámicos con nitrógeno cuaternario, etc (Ganapathy et al., 2000a; Ohashi et al., 1999).

▪ Barrera metabólica

Aunque la capacidad de la placenta para metabolizar sustancias es aproximadamente un 10% de la del hígado adulto, su estratégica localización entre el feto y la madre hace que juegue un papel cualitativamente muy importante en la protección fetal. Además, la capacidad detoxificante de la placenta humana varía dependiendo del perfil genético, el estilo de vida y el estado de salud de la madre, así como de la exposición a agentes químicos, ya que tiene la capacidad de inducir la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos (Paakki et al., 2000).

A pesar de esto, en algunos casos el efecto del metabolismo placentario no es beneficioso. De hecho, la biotransformación placentaria de ciertos xenobióticos no tóxicos puede llevar a la formación de metabolitos nocivos para el feto, como ocurre con los benzopirenos o el anticonvulsivo fenitoína. Concretamente, en el caso de la fenitoína se ha descrito que el metabolismo placentario es el responsable de la formación de intermediarios teratogénicos cuando el fármaco se administra a mujeres embarazadas (Amicarelli et al., 2000).

La maquinaria enzimática implicada en la biotransformación de fármacos a nivel de la barrera placentaria incluye:

1. Enzimas de fase I: Varias enzimas pertenecientes a la superfamilia del citocromo P450 (CYPs) han sido encontradas en la placenta humana. El número y cantidad de CYPs depende de la salud de la madre y su estado gestacional. Además, la abundancia de algunas de estas enzimas se ve modificada por la exposición del feto a algunos xenobióticos, como ocurre con el tabaco (Barnea, 1994; Myllynen et al., 2005). Otras enzimas de fase I cuya expresión se ha detectado en la placenta son las aldehído deshidrogenasas. Estas enzimas participan en la detoxificación de compuestos endógenos y exógenos, incluido el etanol.
2. Enzimas de fase II: Se han detectado en la placenta humana varias enzimas de fase II entre las que se encuentran glutatión-S-transferasas, N-acetil transferasas, epóxido hidrolasas, sulfotransferasas y uridina-5'-difosfato glucuronosil transferasa. Todas ellas intervienen en la conjugación de sustancias hidrofóbicas con grupos voluminosos dando lugar a derivados polares y más fácilmente eliminables (Weier et al., 2008).

Las peptidasas son enzimas que no se incluyen dentro de los clásicos mecanismos de metabolización (fase I y fase II), pero juegan un papel muy importante en la barrera metabólica placentaria ya que rompen algunos péptidos biológicos activos antes de que éstos alcancen el compartimento fetal. Entre ellas se encuentran aminopeptidasas, carboxipeptidasas y dipeptidil peptidasa IV. Son capaces de degradar hormonas peptídicas como la oxitocina o la vasopresina, péptidos opiodes, encefalinas, anafilotoxinas o fibrinopéptidos.

▪ Sistemas de expulsión

Existen varios miembros de la superfamilia de proteínas ABC que desempeñan un papel clave reduciendo las concentraciones de productos potencialmente tóxicos de la célula trofoblástica. La localización de estas bombas exportadoras en la barrera placentaria (en la cara materna) es la óptima para proteger al feto de la entrada de

xenobióticos o para facilitar su eliminación desde el compartimento fetal al materno (Marin et al., 2004).

Varios miembros de la subfamilias *ABCB*, *ABCC* y *ABCG*, relacionados con el desarrollo de resistencias a determinados fármacos, han demostrado ser los mejores candidatos para realizar el transporte activo dependiente de ATP de una gran variedad de compuestos a nivel de la barrera placentaria (Young et al., 2003).

MDR1 fue el primero de los transportadores ABC al cuál se le reconoció un posible papel en la barrera placentaria (Young et al., 2003). Está muy expresado durante toda la gestación, particularmente en el sincitiotrofoblasto (Fromm, 2004). Los sustratos de MDR1 son principalmente moléculas orgánicas de entre 200 Da y 1,9 kDa. Como ya hemos comentado, muchos de ellos son moléculas orgánicas neutras o bases débiles, aunque algunos sustratos son ácidos. En consecuencia, un gran número de fármacos de diferente naturaleza son sustratos de MDR1. Esto sugiere que la presencia en la placenta de la proteína funcional que podría contribuir a la protección fetal frente a diferentes fármacos incluyendo antivirales y antitumorales (Ceckova-Novotna et al., 2006).

Otra isoforma de la subfamilia *ABCB* cuya expresión en la placenta ha sido objeto de estudio, es MDR3 ya que también es capaz de transportar algunos de los sustratos de MDR1 (Smith et al., 2000), por lo que podría participar en la función de barrera de la placenta.

Otras bombas ABC implicadas en la protección del feto frente a la exposición de estos fármacos son los miembros de la subfamilia *ABCC* que participan en el transporte de conjugados de compuestos endógenos y xenobióticos. Como ya se ha mencionado, MRP2 se ha localizado en el sincitiotrofoblasto mientras que MRP1 y MRP3 se han detectado en el endotelio de los vasos capilares además de en el trofoblasto (St-Pierre et al., 2000).

La expresión de Mrp1, Mrp2 y Mrp3 aumenta en presencia de altos niveles de ácidos biliares en el suero materno (Serrano et al., 2003) en el último tercio de la gestación. Todavía no se sabe si estos cambios en la expresión son debidos a la interacción de los ácidos biliares con receptores nucleares, como ocurre en otros tejidos (Kullak-Ublick et al., 2004).

MRP5 se ha encontrado en la membrana basal del sincitiotrofoblasto y alrededor de los vasos fetales (Meyer Zu Schwabedissen et al., 2005), desde dónde además de su papel en la disposición de fármacos podría mediar el eflujo de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) que funcionaría como señales de transducción paracrina.

Por último, la expresión de BCRP en la placenta está muy controlada durante la gestación por diversos estrógenos, factores de crecimiento y citoquinas (Mao, 2008). BCRP transporta una amplia variedad de aniones orgánicos conjugados o no

conjugados, pero desde un punto de vista fisiológico probablemente participe en la eliminación de compuestos endógenos sulfatados (Grube et al., 2007). Recientemente se ha confirmado su capacidad para transportar a través de la placenta gliburide, un fármaco común administrado a pacientes diabéticos, reduciendo la exposición del feto a este fármaco (Gedeon et al., 2008).

2.5. RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares son factores de transcripción, que por medio de su unión a un ligando, adquieren la capacidad de activar o inhibir la transcripción de genes. Constituyen una superfamilia formada por más de 150 miembros (Blumberg and Evans, 1998; Kliewer et al., 1999; Mangelsdorf et al., 1995).

Los receptores nucleares llevan a cabo su acción por unión a zonas reguladoras específicas del gen diana, que reciben el nombre de *elementos respuesta*. Esta unión modifica la expresión del gen, aumentándola, disminuyéndola o potenciando o reduciendo su respuesta a otro factor de transcripción. En general estos elementos respuesta son dos secuencias de seis pares de bases separadas por entre cero y ocho nucleótidos. Están organizados como repeticiones (directas, invertidas o evertidas), cuya especificidad se basa tanto en la secuencia, como en la orientación y en el espacio entre dichas repeticiones.

Los receptores nucleares se pueden clasificar en dos grupos:

- Tipo I o receptores clásicos: activados por su unión a esteroides. Son los receptores de las hormonas esteroideas. Actúan como homodímeros que, una vez activados, se unen a los elementos respuesta, formados por repeticiones invertidas separadas por tres nucleótidos.
- Tipo II o receptores no esteroideos: entre los que destacan los que unen el ácido retinoico (RAR, "Retinoic acid receptor"), las hormonas tiroideas, la vitamina D (VDR), pregnano (SXR, "Steroid X receptor"), androstano (CAR, "Constitutive androstane receptor"), oxisteroles (LXR), los ácidos biliares (FXR, "Farnesoid X Receptor") y el receptor de activación de los peroxisomas (PPAR). Actúan como heterodímeros con el receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR, "Retinoic X receptor"). Sus elementos respuesta están formados por repeticiones de tipo directo o invertido.

Además de estos receptores nucleares, activados por su unión a determinados ligandos, hay otros factores pertenecientes a la familia del "hepatocyte nuclear factor"

(HNF) que también parecen tener una importante función en la regulación de la expresión de proteínas transportadoras hepáticas.

La expresión del receptor nuclear está condicionada según el tipo celular, el periodo de vida del individuo y de la célula, el promotor, el elemento respuesta al que se une y la posible existencia de otras señales (Smirlis et al., 2001).

▪ **FXR**

El receptor FXR se localiza en el núcleo de los hepatocitos y hoy se sabe que sus ligandos son los ácidos biliares (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999). Además de en el hígado, también se expresa en riñón, intestino y en la corteza adrenal (Fayard et al., 2001). Su expresión está bajo el control de otro factor de transcripción, el HNF-1 α , cuyos activadores podrían ser también los ácidos biliares. Existen cuatro isoformas de FXR generadas por “splicing” alternativo de un único gen (Eloranta and Kullak-Ublick, 2005).

La llegada al núcleo de los ácidos biliares desencadena la activación del FXR, que se une a RXR (principalmente a RXR α , más abundante en el hígado) formando un heterodímero que:

- Inhibe la transcripción hepática de NTCP, limitando así la captación hepática de más ácidos biliares, a la vez que aumenta los niveles de ARNm de BSEP lo que provoca el aumento de excreción de ácidos biliares a la bilis (Ananthanarayanan et al., 2001).
- Aumenta la síntesis del factor de transcripción SHP (“small heterodimer partner”) que, a su vez, bloquea la acción estimuladora de LXR-1 sobre la expresión de los genes CYP7A1 y CYP8B1, que codifican respectivamente la enzima clave de la síntesis de ácidos biliares por la vía neutra, colesterol 7 α -hidroxilasa, y de la enzima clave que lleva a cabo la formación de AC, esterol 12 α -hidroxilasa (Nagano et al., 2004).

Otros mecanismos indirecto de la regulación de la síntesis “de novo” de ácidos biliares a través de FXR, han sido descritos recientemente (Eloranta and Kullak-Ublick, 2005).

Todas estas acciones conducen a la disminución de la síntesis “de novo” de ácidos biliares y al aprovechamiento máximo del “pool” presente en el organismo.

▪ **RXR**

Este receptor se activa con la unión del ácido 9-cis-retinoico. Variaciones en la expresión de RXR van a tener influencia sobre un gran número de genes implicados en el transporte y síntesis de ácidos biliares además de en la regulación de múltiples vías metabólicas. RXR- α se encuentra altamente expresado en hígado, músculos,

pulmón y bazo donde aparecen igualmente sus otras dos isoformas (β y γ), aunque menos expresadas. Cuando se une a su heterodímero FXR, incrementan la expresión de SHP, suprimiendo así la conversión de colesterol en sales biliares (inhibición de la expresión de CYP7A1) y disminuyendo el transporte de ácidos biliares ya que se reduce la expresión de NTCP. Del mismo modo, la ausencia de RXR incrementa significativamente el ARNm de la enzima CYP7A1 (Wan et al., 2000). Aunque la unión del RXR/FXR ejerce una acción negativa sobre CYP7A1, cuando RXR se une a LXR ("Liver X receptor") promueve la expresión de la misma estimulando así la conversión de colesterol a ácidos biliares (Trauner and Boyer, 2003).

▪ SXR

El receptor SXR o receptor de xenobióticos, posee múltiples ligando activadores tales como xenobióticos, UDC, LC, pregnenolona, etc. Entre sus acciones se ha descrito que incrementa la expresión de algunas isoformas de OATPs y MRPs así como la actividad de CYP3A que cataliza reacciones de hidroxilación, siendo el primer paso de detoxificación de fármacos. SXR además incrementa la expresión de MDR1 que media el efecto de determinados fármacos (Synold et al., 2001).

▪ RAR

El receptor RAR tiene como ligando activador al ácido trans-retinoico. En combinación con RXR activa ciertos transportadores como NTCP y MRP2 mediante la unión en el promotor del gen al elemento de respuesta a retinoides. Cabe destacar que el hígado es el principal almacén de vitamina A del organismo.

▪ CAR

Este receptor unido a RXR se une a los promotores de los genes *CYP2B* y *CYP3A* que intervienen en procesos de detoxificación de fármacos (Sueyoshi and Negishi, 2001).

▪ HNF1 α y HNF4

El factor de transcripción HNF1 α está presente principalmente en hepatocitos, pero también se puede encontrar en células epiteliales de otros órganos como túbulos renales, estómago, intestino delgado, colon y páncreas. Puede formar homómeros o heterodímeros y es capaz de regular la transcripción de varios genes implicados en el transporte de ácidos biliares como son el Ntcp, Oatp1 y Oatp2, además de regular la expresión del receptor nuclear FXR.

HNF4 regula muchos genes que se expresan preferentemente en hígado, y está involucrado en el mecanismo de regulación negativa de la síntesis de ácidos biliares independiente de SHP (Abrahamsson et al., 2005). La expresión de genes involucrados en la hidroxilación de ácidos biliares, como CYP7A1, CYP8B1 y CYP27A1 se encuentran marcadamente disminuida en ausencia de HNF4.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material Biológico

Muestras humanas

Las placentas procedentes de mujeres sanas a término, cuyo parto tuvo lugar vía vaginal o por cesárea, se obtuvieron a través del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Salamanca con el consentimiento firmado de las madres.

Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del área de Salud de Salamanca. Los datos personales de las gestantes fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 994/99).

Animales

Se utilizaron ratas gestantes de la raza Wistar procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales tenían libre acceso tanto al agua como al pienso granulado comercial (Panlab, Madrid) y se mantuvieron en habitaciones con temperatura y humedad controladas, dotadas de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.

Para la obtención de oocitos, se utilizaron ranas hembras *Xenopus laevis* (Regine Olig, Hamburgo, Alemania). Se mantuvieron en tanques con agua cuya calidad (pH, dureza, contenido en nitratos, nitritos y cloro) se controlaba periódicamente y se alimentaron con pienso *Xenopus* XE40 (Mucedola, Milán, Italia) e hígado de rata.

En todo momento los animales fueron tratados según las especificaciones de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (“Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook”, 2ª edición, 2002). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

Líneas Celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC; LGC Standard, Barcelona): células JAr (HTB-144) y Jeg-3 (HTB-36), derivadas de coriocarcinoma humano, y Caco-2 (HTB-37), derivadas de adenocarcinoma de colon humano.
- Proporcionadas por la European Collection of Cell Cultures (ECACC; Health Protection Agency, Salisbury, Reino Unido): células BeWo (86082803), derivadas de coriocarcinoma humano.

- La línea celular híbrida de fibroblastos humanos y hepatoma de rata, WIF-B9, fue cedida generosamente por la Dra. Doris Cassio del INSERM (París, Francia) y la sub-línea resistente al cisplatino, WIF-B9/R, fue obtenida previamente en nuestro grupo de investigación (Briz et al., 2003b).

Bacterias

- Se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* proporcionada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.
- La cepa DH10B de *E. coli* fue cedida generosamente por el Dr. José Manuel González Ábalos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca.

3.1.2. Productos

Los productos utilizados en este trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- Abbot Laboratorios (Madrid): isofluorano (Forane[®]), pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Abcam (Cambridge, Reino Unido): anticuerpo primario frente a Na⁺/K⁺-ATPasa (M7-PB-E9).
- AbD Serotec (BioNova Científica, Madrid): anticuerpo primario frente a la glicoproteína CD163 (EDHu-1).
- Air Liquide (Valladolid): CO₂ y N₂.
- Alexis Biochemicals (Lausana, Suiza): anticuerpos primarios frente a MDR1 (C494), MRP1 (MRPm6), MRP2 (M₂III-6), MRP3 (M₃II-9), BSEP (USal-hBSEP-McAb-1) y BCRP (BXP21 y BXP34).
- Ambion (Applied Biosystems, Madrid): acetato de amonio, kit para transcripción “in vitro” “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra” y el líquido estabilizador “RNA^{later}”.
- American Radiolabeled Chemicals (Itisa, Madrid): ácido [³H]-taurocólico (actividad específica 10 Ci/mmol), [³H]-17 β -glucurónido de estradiol (45,8 Ci/mmol) y [³H]-mitoxantrona (10 Ci/mmol).
- AppliChem (Madrid): ácido morfolino propansulfónico (MOPS), agar, extracto de levaduras, fenol, leche descremada liofilizada y triptona.
- Applied Biosystems (Madrid): “SYBR Green I PCR Master Mix”, “Taqman[®] Universal PCR Master Mix” y kit de ARN ribosómico 18S Taqman[®].

- B. Braun (Melsungen, Alemania): sutura de seda.
- Biomers.net (Donau, Alemania): algunos cebadores o “primers”.
- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, marcadores de pesos moleculares de proteínas (“High range”, “Low range” y “Kaleidoscope”), membrana de nitrocelulosa, persulfato de amonio, TEMED y rojo ponceau.
- Chemicon International (Alemania): anticuerpo primario frente a la α -actina del músculo liso (α SMA, MAB1682).
- Fermentas (Quimigranel, Madrid): T4 polinucleótido quinasa.
- GE Healthcare (Barcelona): ácido [14 C]-glicocólico (56,0 mCi/mmol), algunas enzimas de restricción y reactivos de detección ECL (“Enhanced ChemioLuminescence”).
- Invitrogen (Barcelona): ARN de hígado humano, 4,6-diamidino-2-fenilindol (Dapi), estándares de ADN (25 y 100 pb y 1 kb plus) y de ARN (0,24-9,5 kb y 0,5-10 kb), enzima Accuprime® *Pfx* ADN polimerasa, enzima Platinum® *Taq* ADN polimerasa y medio de cultivo F-12K.
- Isogen (De Meern, Holanda): algunos cebadores o “primers”.
- Leo Laboratorios S.A. (Madrid): heparina.
- Merck (Barcelona): ácido fosfomolibdico, etanol, glicerol, isopropanol y placas de sílica gel 60F₂₅₄.
- Millipore (Waters Corporation, Madrid): cartuchos de octadecilsilano (Sep-Pak C18).
- Molecular Probes (Leiden, Holanda): anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo Alexa® 488, anti-IgG de ratón Alexa® 594 y Alexa® 488, kits comerciales “PicoGreen dsDNA Quantitation Kit” y “Ribo-Green RNA-Quantitation Kit” para la cuantificación de ADN y ARN, respectivamente, y el reactivo “SlowFade® Light Antifade”.
- MP Biomedicals LLC (Santa Ana, EE.UU.): líquido de centelleo UniverSol™ ES.
- Packard Bioscience (Groningen, Holanda): solvente.
- Parke-Davis (Barcelona): anestésico con ketamina (Ketolar).
- Perkin Elmer Life Sciences (Boston, EE.UU.): ácido [3 H]-cólico (20,0 Ci/mmol).
- Porphyrin Products, Inc. (Logan, EE.UU.): hidrocloreto de biliverdina (BV).

- Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EE.UU.): ADN ligasa, algunas enzimas de restricción, kit comercial “CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” y plásmido pGEM®-T Easy.
- Pronadisa (Hispalab, S.A., Madrid): agarosa normal, agarosa de alta resolución y agarosa de bajo punto de fusión.
- Qiagen (Izasa, Barcelona): “MiniElute Gel Extraction Kit”, “QIAprep Spin Miniprep Kit” y “RNeasy Kit”.
- Roche (Barcelona): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (Hepes), algunas enzimas de restricción, dispasa II, DNasa I, proteinasa K y tripsina de páncreas porcino.
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE.UU.): anticuerpos primarios frente a citoqueratina-7 humana (CK7, RCK105), GAPDH (6C5) y VE-caderina (Ve-Cad, C-19).
- Sigma-Aldrich (Madrid): acetaminofeno; anticuerpo primario frente a α -tubulina (DM1A); albúmina bovina (fracción V); sal sódica de los ácidos cólico (AC), glicocólico (GC), quenodesoxicólico (QDC), taurocólico (TC), taurolitocólico (TLC) y sulfolitocólico (SLC); azul de bromofenol; azul de Tripán; ácido etilendiamino tetraacético (AEDT); ácido sulfanílico; ampicilina; bilirrubina no conjugada (BR); bolitas marcadoras de densidad; bromosulfoftaleína (BSP); butirato sódico; cloruro de colina; cis-diaminodicloroplatino II (cisplatino); mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1,5 mM, E-64 1,64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80 μ M); collagenasa; carbonato cálcico; dimetilformamida (DMF); dietilfosforocianato; dietilpirocarbonato (DEPC); dimetilsulfóxido (DMSO); dodecil sulfato sódico (SDS); 17 β -glucurónido de estradiol (17 β GE); D-glucosa; glutamina; yoduro de propidio; medios de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)”, “HAT”, “Minimum Essential Medium Eagle (MEM)”, “F-12 Coon’s modification” y “RPMI-1640”, “Hanks Balanced Salts (HBS)”; mezcla de antibióticos y antimicótico (penicilina, estreptomicina y anfotericina B); paraformaldehído; percoll; piruvato sódico; solución Hanks; sulfato de gentamicina; kit para transcripción reversa “Enhanced Avian RT-PCR Kit”; trietilamina anhidra (Et₃N); Triton X-100; trizma base y xileno cianol.
- Sigma-Genosys (Cambridge, Reino Unido): algunos cebadores o “primers”.
- Stressgen Bioreagents (Victoria, Canadá): anticuerpo primario frente a la enzima biliverdina reductasa IX- α (Bvr α , OSA-400).
- T.D.I. (Madrid): suero bovino fetal.
- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético, ácido clorhídrico, agua oxigenada al 30%, arena de mar purificada, bicarbonato sódico, bifosfato sódico, bromuro de etidio, cloroformo, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, cloruro sódico,

dihidrógeno fosfato potásico, etanol absoluto, éter dietílico, fosfato disódico, gel de sílice 60 de tamaño de partícula 0,040-0,063 mm, glicerol, hidróxido sódico, indicador universal de pH, metanol, sulfato de magnesio, tween® 20, reactivo de Folin ciocalteu y medio de montaje entellan®.

Los anticuerpos primarios frente a OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, BSEP (K168) y MRP4 fueron cedidos generosamente por el Dr. Ralf Kubitz de la Universidad Heinrich Heine (Düsseldorf, Alemania).

El anticuerpo primarios frente a Mrp2 de rata (EAG15) y frente a la proteína asociada a “tight-junctions” ZO-1 fueron cedidos generosamente por la Dra. Doris Cassio del INSERM (París, Francia).

Todos los demás reactivos utilizados fueron del grado requerido para cada caso.

3.1.3. Medios instrumentales

Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid). Para pesar los animales se utilizó también una balanza electrónica digital Precisa, modelo 600 C (Grupo Taper). Para la determinación de pH se utilizó un electrodo de marca Crison micro pH 2002 (Crison Instruments, Barcelona). El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron con equipos de purificación de agua por ósmosis inversa Milli-Ro 10 Plus y Milli-Q (Millipore Ibérica, Madrid).

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Huco-Erlöss, Madrid), Megafugue-1.0 R (Heraeus Spatach, Kalsberg, Alemania) y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti (Beckman Instruments, Madrid). También se utilizó una picofuga Stratagene® (VWR International Eurolab, Barcelona).

Para las medidas espectrofotométricas se empleó un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Grupo Taper) y un lector de ELISA modelo 550 Microplate Reader (Bio-Rad, Madrid). Para la cuantificación fluorimétrica se utilizó un fluorímetro Hitachi F-4010 (Grupo Taper) y cubetas de cuarzo de la marca Hellma (DueroLab, Salamanca).

Las filtraciones a vacío se realizaron con una bomba Millipore modelo XX5522050 (Millipore Ibérica, Madrid). Para la esterilización de sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Grupo Taper).

Los vasos sanguíneos se canularon con catéteres Braun de tamaño 0,5 mm x 0,9 mm y de FepTeflon de 0,7 mm x 16 mm (B. Braun Sugical GMBH, Melsungen, Alemania). Para canular el conducto biliar se usaron cánulas de polietileno PE-10 (Biotrol Pharma, París, Francia).

Las bombas peristálticas utilizadas fueron del tipo Microperpex 2132, de LKB Instruments (Farmacia España, Madrid).

Para la PCR analítica y para la transcripción reversa (RT) se utilizó un termociclador modelo RoboCycler Gradient 96 de Stratagene (La Jolla, EE.UU.). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un aparato ABI Prism 5700 Sequence Detection System, de Applied Biosystems.

La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplados a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad, Madrid).

El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue el modelo GelDoc 2000 (BioRad) perteneciente al Instituto de Microbiología-Bioquímica.

La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

Para la evaporación de pequeños volúmenes de solventes, se utilizó un “speed-vacuum” marca Savant modelo SPD121P, acoplado a una bomba de vacío modelo UVS400A (Hucoa-Erlöss, Madrid).

Las homogeneizaciones se realizaron con un homogeneizador Polytron Typ PT 10/35 Kinemática GMBH (Lucerna, Suiza) o un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona).

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema Trans-Blot Cell II utilizando para ello la misma fuente de alimentación, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.

Para el revelado de las películas de autorradiografía se utilizó la máquina modelo Medical X-ray Processor 102 (Kodak), perteneciente al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Universidad de Salamanca).

Para la realización de los cultivos celulares se utilizó una campana de flujo laminar modelo AV-30/70 (Telstar, Barcelona) y una estufa New Brunswick Scientific Co. Inc. (Pacisa). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N₂ líquido.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatzado LAUDA Ecoline Staredition RE 106 (Hucoa-Erlöss).

Los cortes histológicos se realizaron con un criostato (Leica Microsystems, modelo 1900UV, Barcelona). Para visualizar la fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon

Eclipse TE 2000-S (Nikon, Duero Lab) o un microscopio confocal modelo TCS SP2 (Leica), perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca).

Para realizar estudios de transporte de compuestos fluorescentes en líneas celulares se utilizó un microscopio confocal invertido modelo Zeiss LSM510 (Jena, Alemania) que lleva acoplada una cámara termostatzada. Las imágenes de la fluorescencia se recogieron en una cámara CCD, se digitalizaron e integraron con un procesador de imagen Metafluor (Princeton Instruments).

Se utilizaron placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid) en el cultivo de las líneas celulares. La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtros Sterivex de 0,2 µm (Millipore Ibérica).

Para el crecimiento de bacterias se utilizó una estufa termostatzada a 37°C modelo S-20 (Selecta, Barcelona).

Los oocitos se incubaron en una estufa Selecta (Pacisa). La selección de los oocitos se realizó con la ayuda de una lupa ZOOM 2000 (Leica, Búfalo, EE.UU.) y una fuente de luz fría KL750 (Schott, Wiesbaden, Alemania). Para la microinyección de los oocitos de *Xenopus laevis* se utilizó un equipo Nanoliter 2000 (WPI, Hertfordshire, Reino Unido).

La radiactividad de los isótopos ^3H y ^{14}C se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6500 (Beckman Instruments, Madrid), utilizando líquido de centelleo UniverSol (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, EE.UU.).

Para el sistema cromatográfico se dispuso de un equipo para HPLC de la casa Beckman Instruments (Madrid) con los siguientes componentes: una bomba programable (modelo 126) con dos cabezales que permite realizar mezclas binarias en cámaras de alta presión; un inyector de 100 µl de capacidad; una columna de fase reversa ACE5 C18 de 250 mm x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula y un detector Diode Array (modelo 168). Todo el sistema se controló desde un ordenador IBM (modelo 30 286, IBM Corp., Portsmouth, Reino Unido) utilizando el software System Gold (Beckman). La fase móvil se filtró a través de una membrana Durapore de 45 µm de poro y 47 mm de diámetro de la casa comercial Millipore.

También se utilizó un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, LC-MS-MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de HPLC serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con desgasificador de vacío (modelo G12354A) que permite mezclas en baja presión de hasta cuatro solventes; un inyector de 20 µl de capacidad (modelo G1328B); un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax C18 de 30 mm x 2,1 mm y 3,5 µm de tamaño de poro termostatzada a 35°C (Agilent Technologies, Madrid). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) está acoplado a una Fuente de

Ionización a Presión Atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (modelo HP LP2065) utilizando el software Q-TOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite tanto el control del HPLC como del detector de masas.

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de gel de sílice (60 F₂₅₄, 20 x 20 cm) sobre soporte de aluminio, de 0,2 mm de espesor y sobre soporte de vidrio de 2 mm de espesor (Merck). La fluorescencia de los productos se visualizó con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta (Vilber Lourmat, Francia).

Para la realización e interpretación de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H se contó con la colaboración de la Dra. M^a Ángeles Castro del Departamento de Química Farmacéutica y se llevaron a cabo en un aparato Bruker WP 200 SY (200 MHz) utilizando metanol como referencia interna.

Las muestras se conservaron en un congelador -80°C marca Revco (Pacisa) y en contenedores de nitrógeno líquido.

Además se contó con un pequeño equipamiento como un agitador magnético calefactor Selecta (DureoLab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Wilson (Prosisa, Salamanca). Todo el material de vidrio utilizado para las síntesis químicas procedía de Afora (Madrid).

3.2. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES

3.2.1. Síntesis del ácido [¹⁴C]-taurosulfolitocólico ([¹⁴C]-TSLC)

Para la síntesis del ácido biliar marcado radiactivamente [¹⁴C]-TSLC se siguió el método descrito previamente por Momose (Momose et al., 1997), con algunas modificaciones. La reacción de condensación entre el SLC y la [¹⁴C]-taurina en dimetilformamida (DMF) se produjo a temperatura ambiente. Se utilizó como agente acoplante dietilfosforocianidato (Tohma et al., 1987) y como catalizador trietilamina anhidra (Et₃N).

Fórmula molecular: C₂₆H₄₃NNa₂O₈S₂

Reactivos utilizados: SLC, [¹⁴C]-taurina, cianofosfonato de dietilo, Et₃N, DMF, NaOH, HCl, agua destilada, metanol, etanol, cloroformo y ácido acético.

Procedimiento: Se disolvieron 3 µmol de SLC y 1 µmol de [¹⁴C]-taurina (3:1) en 1,5 ml de DMF en agitación constante. Se añadieron 3,6 µmol de cianofosfonato de dietilo y

0,5 ml de Et_3N . La reacción de amidación se llevó a cabo en ambiente de N_2 durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Una vez finalizada la reacción, se diluyó la mezcla con 20 ml de agua destilada para no superar la concentración micelar crítica del ácido biliar. La sal sódica del ^{14}C -TSLC formado se obtuvo añadiendo 1 M de NaOH a la mezcla. El pH de la solución se neutralizó con 0,1 M de HCl. Los productos de la reacción se separaron del exceso de ^{14}C -taurina que no había reaccionado mediante extracción sólido-líquido en cartuchos de octadecilsilano (Sep-Pak C18, Waters Cromatografía S.A.) siguiendo un método clásico (Setchell y Worthington, 1982). Los compuestos formados se recuperaron de los cartuchos con metanol y se secaron. Una vez secos, los productos se disolvieron en metanol y se concentraron y separaron por cromatografía en capa fina en placas de gel de sílice (60F₂₅₄). Como fase móvil se utilizó cloroformo/metanol/ácido acético/agua destilada (64:25:15:2, v/v). Los productos separados en la cromatografía se revelaron con ácido fosfomolibdico para detectar la presencia de los grupos hidroxilo del esqueleto carbonado del ácido biliar.

En paralelo se llevó a cabo la síntesis utilizando SLC y taurina no radiactiva para confirmar la existencia del enlace amida entre el ácido biliar y la taurina por RMN ^1H . En la realización e interpretación del espectro de RMN ^1H se contó con la colaboración del Dra. M^a Ángeles Castro del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca.

Para confirmar la formación del enlace amida también se sometió al producto de la síntesis no radiactiva a una reacción de desamidación enzimática catalizada por la enzima colilglicil hidrolasa (EC 3.4.1.24). Esta reacción de desconjugación se basa en la liberación de la molécula del ácido biliar de su aminoácido conjugante, en este caso la taurina, mediante hidrólisis enzimática (Setchell y Matsui, 1983). Para ello añadimos sobre 100 nmol del producto sintetizado 1,5 ml de tampón fosfato 100 mM, pH 5.6. A continuación se añadieron 6 unidades de la enzima disuelta en 0,5 ml del tampón fosfato y se incubaron 16h a 37°C. Para parar la reacción se añadieron 10 ml de etanol y la muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4°C. Tras separar y secar el sobrenadante, el producto de la reacción disuelto en agua destilada se pasó por cartucho C18 y se recuperó con metanol. La hidrólisis del enlace amida se determinó mediante la comparación de los coeficientes de retención (R_f) del SLC, del producto sintetizado y del producto hidrolizado tras su separación por cromatografía en capa fina utilizando como fase móvil cloroformo/metanol/ácido acético/agua destilada (64:25:15:2, v/v). Los productos separados en la cromatografía se revelaron con ácido fosfomolibdico

El TSLC no radiactivo sintetizado se utilizó como patrón en la TLC para extraer la banda correspondiente al ^{14}C -TSLC mediante raspado. El producto se purificó por cromatografía en columna eluyendo con metanol.

3.2.2. Síntesis de colilglicilamido fluoresceína (CGamF)

Para la síntesis del derivado fluorescente colilglicilamido fluoresceína (CGamF) se utilizó el método descrito por Sherman y Fisher (Sherman y Fisher, 1986), según el cual se obtiene este compuesto por reacción entre el GC y el isotiocianato de fluoresceína (FITC) en DMSO a 95°C. El producto mayoritario de la reacción es aquel en el que el FITC se une al grupo carboxilo del GC mediante un enlace amida (Schteingart et al., 1992).

Fórmula molecular: C₄₇H₅₂N₂O₁₀

Reactivos utilizados: GC, FITC, DMSO, agua destilada, HCl, acetato de etilo, metanol, cloroformo, NaCl y Na₂SO₄ anhidro.

Procedimiento: Se disolvieron 0,25 mmol de FITC y 0,25 mmol de GC en 2 ml de DMSO, y se calentó a 95°C durante 1 h. Al cabo de ese tiempo, cuando la mezcla se enfrió, se añadieron 40 ml de agua y se acidificó esta solución con HCl 1 N hasta pH<3. El ácido biliar fluorescente, soluble en acetato de etilo, se extrajo con este solvente orgánico en un embudo de decantación. La extracción se repitió otras dos veces, recogiendo la fase orgánica. El siguiente paso consistió en eliminar primero los restos de ácido, lavando con una disolución saturada de NaCl, y eliminar después los restos de agua, añadiendo Na₂SO₄ anhidro y filtrando por papel.

En ese punto se comprobó por cromatografía en capa fina, utilizando como fase móvil cloroformo:metanol (7:3), qué compuestos se obtuvieron en la reacción anterior, disolviendo previamente en metanol el producto sólido obtenido al secar la fase orgánica de acetato de etilo. Al ver la placa a la luz UV se observó una mancha fluorescente, que también se tiñó con ácido fosfomolibdico, y que correspondía a la CGamF.

Por último se purificó este ácido biliar fluorescente por medio de una cromatografía preparativa consiguiendo una pureza mayor del 95%. Se disolvió en metanol y se centrifugó para eliminar los restos de sílice. Se comprobó por cromatografía en capa fina que la separación había sido correcta y se evaporó el metanol para guardar la CGamF seca, protegida de la luz y a temperatura ambiente.

3.3. EXPERIMENTOS “IN VIVO” EN RATAS GESTANTES

3.3.1. Modelo de colestasis obstructiva

La colestasis obstructiva se indujo en ratas el día 14 de gestación, es decir, al comienzo de la tercera y última semana de gestación, para mimetizar el periodo de

colestasis intrahepática en mujeres, que suele corresponder al último tercio de la gestación. Este modelo experimental se utilizó para estudiar el efecto del bloqueo de la secreción biliar sobre la expresión de la enzima biliverdina reductasa IX α (BVR α) en el eje hígado fetal-placenta-hígado materno.

Tras anestesiarse al animal con isoflurano (Forane[®]), se afeitó el campo operatorio, se desinfectó con tintura de yodo y se practicó una laparotomía media de 4-5 cm desde el cartílago xifoides. Tras separar el conducto biliar común, se realizó una ligadura doble por encima de la desembocadura de los conductos pancreáticos y se cortó el conducto entre las dos ligaduras. A continuación, se cerró la cavidad abdominal por planos con sutura continua en el peritoneo y músculo, y con puntos individuales en "U", en el caso del plano cutáneo. La región abdominal se impregnó exteriormente con un antiséptico (aerosol de violeta de genciana) para evitar posibles infecciones. Los animales se dejaron recuperar de la anestesia bajo una lámpara calefactora.

A término se extrajeron los órganos (hígado fetal-placenta-hígado materno) y tras lavarlos con solución salina, se secaron ligeramente, se pesaron y congelaron en nitrógeno líquido mediante la técnica de "freeze-clamping". Las muestras de tejidos se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

3.3.2. Modelo de placenta de rata perfundida "in situ"

En los estudios de excreción de pigmentos biliares por el binomio placenta-hígado materno, utilizamos el modelo experimental de placenta de rata perfundida "in situ" puesto a punto anteriormente en nuestro grupo de investigación (Briz et al., 1998).

Se utilizaron ratas Wistar gestantes controles en el día 21 de la gestación.

Tras anestesiarse al animal utilizando pentobarbital sódico por vía intraperitoneal a la dosis de 50 mg/kg p.c., se fijó a una tabla-quirófano y se peló y afeitó el campo operatorio. La intervención quirúrgica se inició practicando una traqueotomía de rutina. A continuación se disecó la vena yugular izquierda y se insertó en ella un catéter de polietileno heparinizado que se utilizó para la infusión de soluciones. Asimismo, en la arteria carótida izquierda se introdujo otro catéter heparinizado para la recogida de muestras de sangre.

Seguidamente, se practicó una laparotomía ventral media y se disecó el conducto biliar común (para lo que fue necesario retirar parcialmente el tejido pancreático) por encima de la desembocadura de los conductos pancreáticos. Después, mediante una incisión en pico de flauta, se introdujo una cánula de polietileno por la cual fluía la bilis.

Se realizó una histerectomía y se expuso un feto. A continuación, se introdujo una cánula de polietileno por la arteria umbilical y se fijó con una gota de cianoacrilato. Posteriormente, se cortó el cordón umbilical entre el feto y el lugar de canulación y se

administró sobre el útero un relajante muscular (nifedipino). En la vena umbilical se realizó una incisión para favorecer la salida del medio.

Entonces, se prefundió la placenta expuesta con solución salina heparinizada a 37°C a un flujo constante de 500 µl/min mantenido mediante una bomba peristáltica. A la entrada de la placenta se colocó una columna capilar conectada a la vía de perfusión umbilical mediante una llave en “T” para monitorizar la presión de perfusión, la cual debía ser relativamente constante e inferior a 20 cm de agua durante el experimento, para que se considerara válido.

Para estudiar el procesamiento de la BV por el binomio placenta-hígado materno comparado con el hígado materno o a la placenta por separado, se realizaron cuatro series de experimentos:

I.- Administración a la madre de un bolo de 0,1 µmol de BV a un flujo de 50 µl/min durante 5 min, a través de la vena yugular.

II.- Administración a la placenta de 1 µmol de BV a un flujo de 500 µl/min durante 5 min (mediante un único paso), seguidos de una perfusión continua con solución salina heparinizada hasta el final del experimento, a través de la arteria umbilical.

III.- Para evitar la biotransformación de la BV que alcanzaba la circulación materna por el hígado y riñones maternos, se aislaron rápidamente ambos órganos de la circulación materna mediante ligaduras previamente colocadas alrededor de la vena porta, la arteria hepática y de las venas y arterias renales justo antes de que se administrara 1 µmol de BV por arteria umbilical. En este caso, para comprobar la viabilidad de las preparaciones durante el experimento, se midieron en suero los niveles de glucosa (Glucometro Accu-Check Sensor, Roche) y de urea (apartado 3.11.8).

IV.- Para estudiar el perfil de la acumulación de pigmentos biliares en suero, se realizaron experimentos similares salvo que el aislamiento vascular del hígado y de los riñones no fue seguido de la administración de BV a través de la arteria umbilical.

A lo largo de los experimentos se recogieron periódicamente muestras de suero y bilis de las madres para llevar a cabo medidas analíticas. La recogida de muestras de bilis se inició a los 20 min después de interrumpir la circulación enterohepática y se utilizaron viales previamente tarados, que posteriormente se pesaron para determinar el flujo biliar gravimétricamente, al considerar que la densidad relativa de la bilis es aproximadamente igual a uno (Klaassen, 1974). Para prevenir la degradación de los pigmentos biliares, los viales se mantuvieron en hielo protegidos de la luz.

Durante todo el experimento se monitorizó la temperatura rectal del animal que se mantuvo entre 37-38°C.

Al finalizar el periodo experimental, el hígado materno, los riñones y las placentas se extrajeron, y tras lavarlos con solución salina, se secaron ligeramente, se pesaron y congelaron en nitrógeno líquido mediante la técnica de “freeze-clamping”. Las muestras de tejidos se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización. También se recogieron muestras de sangre materna.

Soluciones utilizadas:

- El medio de perfusión utilizado fue una solución salina heparinizada (heparina 0,05%, NaCl 150 mM, pH 7,8)
- Para la preparación de las soluciones de BV se utilizó la mínima cantidad posible de DMSO (< 0,2% en la solución final) para su disolución inicial y se ajustaron las concentraciones finales con solución salina.

3.4. AISLAMIENTO DE TROFOCITOS DE PLACENTA HUMANA

Para obtener trofocitos humanos se utilizó el método puesto a punto en el Trabajo de Grado realizado por la Lda. Silvia Martín Prado (Serrano et al., 2007).

Se utilizaron placentas procedentes de mujeres sanas a término que se procesaban en un periodo máximo de una hora tras el parto.

El tejido placentario se lavó previamente en medio 199 y tras fragmentarlo mecánicamente, se lavó varias veces con tampón fosfato salino o PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7.4). A continuación se realizaron 4 digestiones sucesivas del tejido mediante su incubación a 37°C durante 15 min con una mezcla de proteasas y una nucleasa para romper el ADN. La mezcla de enzimas contenía a partes iguales tripsina (0,23%, p/v) y una solución de dispasa II (2,4 U/ml) y DNasa I (0,023%, p/v), en solución Hank's. Las células disgregadas que se fueron obteniendo se precipitaron y se resuspendieron en medio DMEM. Posteriormente se filtraron a través de una gasa de algodón estéril y a continuación, se pasaron por filtros de células de 70 µm de tamaño de poro (Becton-Dickinson). Por último, las células se sometieron a dos gradientes de Percoll sucesivos, donde de forma paralela se utilizaron bolitas marcadoras de densidad de distintos colores, para identificar las bandas celulares. Se recogieron las células de la capa situada entre las densidades 1,049 y 1,062 g/ml que estaban enriquecidas en células trofoblásticas.

La viabilidad se determinó por el test de azul de tripán, obteniéndose valores entre el 90-95% de células vivas y el enriquecimiento en trofocitos se determinó por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo frente a la citoqueratina-7 humana (CK7) y contando las células en un microscopio de fluorescencia.

Las células se sembraron en cubres estériles dentro de placas de cultivo, para el marcaje por inmunofluorescencia (apartado 3.10.). Se utilizó como medio de cultivo DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%.

3.5. CULTIVOS CELULARES

El medio de cultivo estéril para la línea celular BeWo fue F-12K suplementado con: 2 mM de L-glutamina y 26,2 mM de bicarbonato sódico.

El medio de cultivo estéril para la línea celular JAr fue RPMI 1640 suplementado con: 2 mM de L-glutamina; 26,2 mM de bicarbonato sódico; 4,5 g/L de glucosa; 10 mM de Hepes y 1 mM de piruvato sódico.

El medio de cultivo estéril para las líneas celulares Jeg-3 y CaCo-2 fue MEM suplementado con: 2 mM de L-glutamina, 26,2 mM de bicarbonato sódico y 1 mM de piruvato sódico.

El medio de cultivo estéril para la línea celular WIF-B9 fue F12 Coon's Modification suplementado con: 26,2 mM bicarbonato sódico y medio HAT (hipoxantina 10 μ M, aminopterina 0,037 μ M, timidina 16 μ M). La sublínea resistente al cisplatino WIF-B9/R creció en presencia de una concentración de este fármaco de 10 μ M.

A todos se les añadió suero bovino fetal inactivado al 10% (v/v), salvo a las WIF-B9 y WIF-B9/R que llevaban suero bovino fetal no inactivado al 5% (v/v). La inactivación del suero se realizó a 56°C durante 30 min.

También se añadió una mezcla de antibióticos y antimicóticos al 1% que contenía: penicilina (20 U/ml), estreptomycin (0,02 mg/ml) y anfotericina B (0,05 μ g/ml).

Tanto al recibir las células como al recuperarlas del N₂ líquido en el que se almacenaban la descongelación de los criotubos se hizo en condiciones de esterilidad en baño maría a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 250 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se pasó a frascos Roux que se introdujo en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5% de CO₂ en aire y humedad relativa del 80%.

El crecimiento de las células se produjo tras la adhesión a la superficie de la placa. Una vez confluyente el cultivo se realizó una tripsinización (siguiendo las instrucciones del proveedor) para desprender las células de la placa de cultivo, y así, poder realizar los pases, sembrar las placas para los distintos tipos de experimentos o bien congelar alícuotas para su almacenamiento.

3.5.1. Exposición de las células en cultivo a compuestos colefílicos

Estudio de la toxicidad del acetaminofeno en células JAr, Jeg-3 y BeWo

Para determinar la toxicidad del acetaminofeno (APAP), se realizó un ensayo de viabilidad celular en presencia de dosis crecientes del fármaco (de 0 a 40 mM), para cada línea celular. Para ello, las células JAr y Jeg-3 se sembraron a una densidad de 12.500 células/pocillo en placas de 96 pocillos (100 µl/pocillo) y las células BeWo se sembraron a una densidad de 50.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos (200 µl/pocillo), según si se fuera a determinar la viabilidad celular por el test de formazán o del rojo neutro (apartado 3.11.3.), respectivamente. A las 24 h se sustituyó el medio de cultivo por medio que contenía el fármaco a la concentración deseada. La viabilidad celular se determinó después de 48 h de incubación en presencia de APAP.

Efecto del acetaminofeno a concentraciones subtóxicas sobre la expresión de bombas ABC en células JAr, Jeg-3 y BeWo

Se escogió como dosis subtóxica la concentración inmediatamente anterior a aquella donde comenzó a verse un aumento de la muerte celular.

Para el estudio del efecto subtóxico del fármaco, las células se utilizaron en el tercer pase posterior a su descongelación. Se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/pocillo (para las células JAr y Jeg-3) o de 2×10^5 células/pocillo (para las células BeWo), en placas de 6 pocillos (2 ml/pocillo). Esta densidad fue la adecuada para que las células estuvieran en fase de crecimiento exponencial durante el tratamiento. A las 24 h se sustituyó el medio de cultivo por otro que contenía la dosis subtóxica de APAP determinada para cada línea celular. Después de 48 h de incubación con el fármaco, se recogieron las células para determinar cambios de expresión de transportadores ABC a nivel del ARNm (apartado 3.6.).

La solución madre de APAP se diluyó con el medio de cultivo para obtener las distintas concentraciones del fármaco, según los casos. Se utilizó una pequeña cantidad de DMSO (<0,2% en la solución final) para su disolución inicial.

Efecto de aniones orgánicos sobre la expresión de bombas ABC en células JAr, Jeg-3 y BeWo

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (2 ml/pocillo) a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células/pocillo (para las células JAr y Jeg-3) y de 7×10^5 células/pocillo (para las células BeWo), o de 1×10^5 células/pocillo (para las células JAr y Jeg-3) y de 2×10^5 células/pocillo (para las células BeWo), según si el tratamiento era de 24 h o de 48 h, respectivamente. Esta densidad fue la adecuada para que las células estuvieran en fase de crecimiento exponencial durante el tratamiento. 24 h tras la siembra, se cambió el medio de cultivo por medio fresco que contenía 5 mM de butirato sódico ó 50 µM de QDC. Después de 24 h de incubación con el butirato o de 48 h con el QDC,

se recogieron las células para la determinar cambios de expresión de transportadores ABC a nivel del ARNm (apartado 3.6.).

Las soluciones madre de butirato sódico y QDC se disolvieron directamente en el medio de cultivo.

Acumulación de FITC/CGamF en células WIF-B9 y WIF-B9/R

Las células se sembraron en placas de 3 cm de diámetro con 2 ml de medio de cultivo y los experimentos se llevaron a cabo cuando el cultivo alcanzó subconfluencia. Para ello, se eliminó el medio de las placas por aspiración y se lavaron 2 veces con medio a 37°C. En cada placa se añadieron 2 ml de medio de cultivo sin suero bovino fetal que contenía 2 µM de FITC o de CGamF y se incubaron en la estufa a 37°C durante el tiempo correspondiente. A continuación se lavaron las placas 4 veces con medio enfriado en hielo y se determinó el contenido celular del compuesto fluorescente (apartado 3.11.5.).

Eflujo de FITC/ CGamF en células WIF-B9 y WIF-B9/R

Las células se sembraron en cubres de vidrio circulares de 22 mm de diámetro que se colocaron en placas de 3 cm de diámetro con 2 ml de medio de cultivo. Se eliminó el medio de las placas por aspiración y se lavaron 2 veces con medio de cultivo sin suero bovino fetal a 37°C. Se cargaron durante 1 h a 37°C con 2 µM de FITC o de CGamF disueltos en el medio de cultivo. A continuación se lavaron 4 veces con medio de cultivo sin suero bovino fetal enfriado en hielo. Cada cubre se colocó en una cámara termostatzada acoplada a un microscopio confocal invertido con 1 ml de medio Tyrode-Hepes (144 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM NaH₂PO₄, 1,25 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, Hepes 10 mM, pH 7.4) a 37°C. Se seleccionó una zona del cultivo en el equipo de imagen del microscopio y se monitorizó la fluorescencia de varias células durante 30 min.

3.6. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm POR PCR CUANTITATIVA

Para determinar los niveles de expresión de genes implicados en el transporte y metabolismo de aniones orgánicos se utilizó una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1986), la PCR cuantitativa a tiempo real. Esta técnica además de amplificar una secuencia específica de ADN, permite cuantificar de forma absoluta o relativa el producto acumulado en la reacción durante la fase exponencial del proceso, cuando todos los componentes de la reacción están en exceso y no son limitantes.

La PCR cuantitativa se realizó en el termociclador ABI Prism 5700 (Applied Biosystem) que detecta la fluorescencia emitida por un fluorocromo excitado a una determinada longitud de onda. En la mayoría de los casos se utilizó SYBR Green I (componente de la mezcla de reacción "SYBR Green PCR Master Mix"). Este compuesto se une al surco menor de cualquier doble hélice de ADN generada aumentando enormemente su propiedades fluorescentes. El incremento de fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto sintetizado. Además, nos permite confirmar la especificidad de los productos amplificados, a través de un ciclo de desnaturalización que se programa al terminar la PCR. La curva de disociación que se obtiene al representar la primera derivada de la absorbancia frente a la temperatura de desnaturalización o "melting temperature" (T_m), sólo tendrá un pico cuando un único fragmento de ADN haya sido amplificado.

En algunos casos fue necesario el uso de sondas Taqman® que son oligonucleótidos complementarios a una de las cadenas del ADN diana y se localizan entre el cebador directo ("forward", Fwd) y el inverso ("reverse", Rev). Llevan unidos dos fluorocromos, uno en el extremo 5' ("reporter") y otro en 3' ("quencher"). A medida que la reacción progresa, la actividad 5'→3' exonucleasa de la AmpliTaq ADN polimerasa degrada la sonda a su paso liberando al "reporter" y aumentando la emisión de su fluorescencia, que es proporcional al producto generado.

Para cuantificar el producto durante la fase exponencial del proceso se define el ciclo umbral o "cycle threshold" (C_t) como el primer ciclo durante el que se detecta un aumento estadísticamente significativo de la fluorescencia por encima de un umbral arbitrario. Este valor de C_t es inversamente proporcional al número de copias del transcrito. Si la amplificación es exponencial, la pendiente de la recta que relaciona el C_t con el logaritmo del número de copias será -3,32, ya que se requieren 3,3 ciclos para generar un incremento de 10 veces en el producto. Si la amplificación es menos eficiente la pendiente será mayor.

Para corregir las pequeñas variaciones que pueden producirse en la obtención del ARN total y en la transcripción reversa (RT), se determinaron los niveles de expresión del gen normalizador ARN ribosómico (ARNr) 18S utilizando los reactivos "Taqman® Ribosomal RNA Control Reagents Kit" y la mezcla de reacción "Taqman® Universal PCR Master Mix".

3.6.1. Extracción de ARN total

Para extraer el ARN total a partir de homogenados de tejido o de extractos celulares, se utilizó el kit comercial "RNeasy® spin columns" (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron aproximadamente 30 mg de tejido ó 1×10^6 células, según el caso.

Las muestras de tejidos se recogieron con material quirúrgico previamente tratado con inhibidores de ARNasas y se conservaron inmediatamente a -80°C en el agente de estabilización “RNA/ater” (Qiagen) hasta el momento de la extracción del ARN total. Para comenzar, las muestras se lisaron y homogeneizaron en un tampón desnaturizante que contenía tiocianato de guanidina, que inactiva las ARNasas y asegura la integridad del ARN durante la extracción. A continuación se añadió etanol, para proporcionar las condiciones adecuadas de retención, y las muestras se aplicaron a las columnas, donde el ARN se une a las membranas y los contaminantes se eliminan por lavados y centrifugaciones sucesivas. Finalmente, el ARN total se eluía de las columnas con agua bidestilada libre de ARNasas.

Una vez extraído, el ARN total se trató con ADNasa I y se cuantificó fluorimétricamente utilizando el método de RiboGreen (apartado 3.11.1).

La integridad del ARN extraído se comprobó mediante la visualización de las bandas del ARNr 18S y 28S tras ser sometido a electroforesis en gel de agarosa desnaturizante al 1% (apartado 3.6.6). Las muestras (0,5 µg del ARN total extraído) se disolvieron en una solución de carga desnaturizante con bromuro de etidio y se incubaron a 75°C durante 10 min antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizaba en tampón MOPS a voltaje constante. Al finalizar, los geles se fotografiaron en un transiluminador. Se consideró que el ARN extraído no se había degradado si eran visibles, de forma nítida y localizada, las bandas correspondientes al ARNr 18S y 28S.

3.6.2. Transcripción reversa (RT)

Para sintetizar el ADN complementario (ADNc), que se usaría como molde en la PCR, se realizó una RT del ARN total extraído utilizando el método comercial “Enhanced Avian RT-PCR Kit” que contiene la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de las aves (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase, AMV-RT).

La reacción se inició incubando durante 5 min a 65°C 2 µg del ARN total con una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y “random” hexameros u “oligo-dT”, según el caso, que actuaron como cebadores o “primers” de la transcripción. A continuación, para que se llevase a cabo la síntesis del ADNc, se añadió la enzima AMV-RT en su tampón adecuado y las muestras se incubaron primero 10 min a 25°C seguidos de un ciclo de 50 min a 50°C, cuando se utilizaron “random” hexameros, o sólo un ciclo de 50 min a 50°C, cuando se usaron “oligo-dT” como cebadores. Por último, se calentaron 5 min a 85°C, para inactivar la retrotranscriptasa, evitando así su posible interferencia en pasos posteriores.

3.6.3. Diseño de cebadores y sondas TaqMan®

Los cebadores o “primers” específicos para el ADN codificante de cada una de las proteínas a estudiar se diseñaron con el programa “Primer Express” y su especificidad se chequeó con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El programa busca cebadores teniendo en cuenta las siguientes pautas:

- El fragmento a amplificar o amplicón, tendrá un tamaño de entre 50 y 150 pb.
- Mantener el contenido de G-C en el rango de 20-80%.
- Evitar varios nucleótidos idénticos seguidos, especialmente guaninas (<4G).
- La temperatura de desnaturalización debe estar entre 58-60°C.
- Los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' no deben tener más de 2 G y/o C.

Los cebadores se diseñaron, en la medida de lo posible, a caballo entre dos exones codificantes utilizando como secuencia de referencia la secuencia del ARNm publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen.

Una vez diseñados, los cebadores fueron suministrados liofilizados por las casas comerciales Sigma-Genosys, Isogen o Biomers.net. Antes de su uso, se reconstituyeron en agua bidestilada y se valoraron por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

Cuando fue necesario, se diseñaron sondas TaqMan® utilizando el mismo programa y se verificó su especificidad utilizando el programa BLAST. Las sondas, marcadas en el extremo 5' con el fluorocromo FAM (6-carboxifluoresceína) y en 3' con el fluorocromo TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina), fueron proporcionadas por Applied Biosystems y se encontraban disueltas en acetonitrilo/H₂O al 20% (v/v). Previo a su utilización se valoraron por espectrometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

En las tablas 1, 2 y 3 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores y de las sondas TaqMan® utilizadas para la cuantificación absoluta o relativa, según los casos, de la abundancia del ARNm de los transportadores de aniones orgánicos humanos, de rata y de los receptores nucleares humanos, respectivamente. En la tabla 2 también están recogidos los cebadores para la detección del marcador de células trofoblásticas, el lactógeno placentario de rata tipo II (LP II, gen *Pr13b1*) y de la enzima Bvra (gen *Bvra*).

El tamaño de los amplicones y los números de acceso de las secuencias diana para cada gen publicadas en la base de datos GenBank están detallados en cada una de las tablas.

Tabla 1. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes humanos por RT-PCR cuantitativa.

Proteína/Gen	Cebador Fwd (5'→3')	Cebador Rev (5'→3')	Amplicón (pb)	Nº de Acceso
OST α (MGC39807)	TTCCAGGTTCTCCTCATCCTGAC	AATTCATCACTTGAGACCTGGTTTT	120	NM 152672
OST β (FLJ26090)	TGGCAGCTGTGGTGGTCATT	TGGTGGCTGCATCGTTTCTT	90	NM 178859
OATP1A2 (SLC01A2)	AAGACCAACGCAGGATCCAT	GAGTTTCACCCATTCCACGTACA	101	NM 021094
OATP1B1 (SLC01B1)	GAATGCCCAAGAGATGATGCTT	AACCCAGTGCAAGTGATTTCAAT	154	NM 006446
OATP1B3 (SLC01B3)	GTCCAGTCATTGGCTTTGCA	CAACCCAACGAGAGTCCTTAGG	111	NM 019844
OATP2B1 (SLC02B1)	CCCAGCACTCGTGTGGAATA	GCACGTTGAGTCGCAQGGAT	156	NM 007256
MDR1 (ABCB1)	GCCTACTTGGTGGCACATAAAC	GCACCAAAGACAACAGCTGAAA	74	NM 000927
MDR3 (ABCB4)	TGATGTGGAACCGATGGACT	CATCATCGCCTGGTCCAAA	191	NM 000443
BSEP (ABCB11)	ACATGCTTGCGAGGACCTTTA	GGAGGTTCTGTCACCAGGTA	106	NM 003742
MRP1 (ABCC1)	CCGCAGATCTTAAAGTTGCTCA	TGCCACTGACGAAGCAGATG	151	NM 004996
MRP2 (ABCC2)	GGCAGTGAAGAAGAAGACGATGA	ATTGGACCTAGAAGTGCAGCT	132	NM 000392
MRP3 (ABCC3)	TCTGCTCGGCTGGAGTCG	TCAGCTTGATGCGCGAGTC	121	AF085690
MRP4 (ABCC4)	TGCAAGGGTTCTGGGATAAAGA	CTTTGGCACTTTCTCAATTAACG	140	NM 005845
MRP8 (ABCC11)	CGGTCTCCTTTATTCTCCACACA	AGCCTCTTAAAGTGGCTGATGAAGT	101	NM 032583
BCRP (ABCG2)	TTAAGTGGAACTGCTGCTTTAGAGT	TCGGTCTTAACCAAAGGCTCA	134	BC021281
FIC1 (ATP8B1)	GGGCGTCACTGCAATCAAA	TTTGAACCTGCCATCCTTAATGA	106	NM 005603

Sondas TaqMan[®] (5'→3') utilizadas para *ABCB11*, CCATCCGGCAACGCTCCAAGTCT; para *ABCC1*, ACCGTCTGCTGTTTGTCACTGCC; y para *ABCC3*, TGGCCGTGAAGATGCGC.

Tabla 2. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de rata por RT-PCR cuantitativa.

Proteína/Gen	Cebador Fwd (5'→3')	Cebador Rev (5'→3')	Amplicón (pb)	Nº de Acceso
Bvra (Bvra)	TTGGAGTGGTAGTGGTTGGTGTT	TCCAAAGAAATCTGCCGTACTTC	151	BC078766
LP11 (Pr13b1)	TCCTTATGCTGGCAGTTTCAAC	CCAAACTGTCTACCGAAGTTCA	176	M13749
Oatp1a1 (Slco1a1)	CTACTGCCCTGTTCAAGGCC	ATTGTATCTCTCAGGATCCGAGG	68	L19031
Oatp1a4 (Slco1a4)	TGCGGAGATGAAGCTTACC	TCCTCCGTCACTTTCGACCTT	69	U88036
Oatp1b2 (Slco1b2)	AGACGTTCCCATCACAACCAC	GCCTCTGCAGCTTTCCTTGA	68	AJ 271682
Mdr1 (Abcb1)	AACCCATGGCTGGAACA	TGGGCTCCTGGGACACAAT	100	NM 012623
Mdr2 (Abcb4)	ACTGTCCGGAATGCAGATGTC	TCTTTATCAGCTCACTGTGGCTTC	82	NM 012690
Bsep (Abcb11)	GCCATTGTGCGAGATCCTAAA	TGCAGGTCCGACCTCTCT	118	NM 031760
Mrp1 (Abcc1)	GTGAAGCTTTCGTGTACTGGAA	TACATGATTGCACAGGAAAAGGA	90	NM 022281
Mrp2 (Abcc2)	TGATCGGTTTGCTGAAGAGCT	ACGCACATTCCTCAACACAAA	139	NM 012833
Mrp3 (Abcc3)	TCCCCTTCTCGGAGACAGTAACT	CACCTTAGCATCACTGAGGACCTT	90	NM 080581
Bcrp (Abcg2)	ATGATGCTCTTTTCTGGCCTCT	AAGCCATATCGAGGAATGCTAAA	92	NM 181381

Tabla 3. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de los receptores nucleares humanos por RT-PCR cuantitativa.

Proteína/Gen	Cebador Fwd (5'→3')	Cebador Rev (5'→3')	Amplicón (pb)	Nº de Acceso
CAR (NR1I3)	AGAGCTGATCCGGACACTCCT	GGAGGCCTAAACTGCACAACT	81	BC069651
FXR (NR1H4)	TCTCCTGGGTCGCCTGACT	ACTGCACGTCCCAGATTTCAC	122	NM 005123
HNF1α (TCF1)	CCTGTCCCAACACCTCAACAA	TTGAAACGGTTCCTCCGC	186	NM 000545
HNF4 (NR2A1)	AAGAGGAACCAGTGCCGCTA	CGCATTGATGGAGGGCAG	141	X87870
RARα (NR1B1)	ACCGGGACAAGAACTGCATC	TTGGACATGCCCACTTCAAA	91	NM 001033603
SHP (NR0B2)	GGCTTCAATGCTGTCTGGAGT	CCCTTTCAGGCAGGCATATT	71	NM 021969
SXR (NR1I2)	GCCCAGTGTCACGCAGAT	GGCCCTCCTGAAAAAGCC	127	NM 003889

3.6.4. Realización de la PCR cuantitativa

Las condiciones de temperatura para la PCR fueron, en todos los casos, las mismas. Las muestras se incubaron primero 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C, y por último, se sometieron a 40 ciclos de 15 seg a 95°C y de 1 min a 60°C.

Como se mencionó anteriormente, tras finalizar la reacción de PCR, las muestras se calentaron en el termociclador desde 60 a 95°C, mientras que se monitorizó la fluorescencia, para obtener las curvas de desnaturalización del ADN amplificado.

Durante la puesta a punto de los métodos para amplificar el ADNc de cada proteína, se comprobó la especificidad de la reacción de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizante al 2,5% (apartado 3.6.6.) de los productos amplificados y de los blancos de reacción. Se incluyó en todos los geles un estándar comercial de ADN de 25 pb. Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón TAE a voltaje constante (80 V).

La abundancia del ADN problema se corrigió por la del ARNr 18S, determinado paralelamente en cada muestra. Las determinaciones se realizaron siempre por triplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos en los que se sustituyó el ADNc por agua bidestilada.

3.6.5. Cuantificación de los resultados

Cuantificación Absoluta

Para la cuantificación absoluta se realizaron rectas de calibrado utilizando diluciones seriadas a partir de una cantidad conocida de un fragmento ADNc de cada gen obtenido por PCR a partir de un tejido o línea celular donde está abundantemente

expresado. Para ello, el tamaño de los productos de PCR se comprobó por electroforesis en geles de agarosa no desnaturizante al 2,5% (apartado 3.6.6.) teñidos por inmersión durante 15 min a temperatura ambiente en una solución de bromuro de etidio 5 µg/ml disuelto en TAE y protegidos de la luz. La banda correspondiente al amplicón en cada caso se extrajo del gel y se purificó utilizando el kit QIAquick Extraction Gel (Qiagen), siguiendo las especificaciones del proveedor. Tras valorar por PicoGreen la cantidad de ADN purificado, se calculó el número de copias/µl del amplicón utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Nº de copias/}\mu\text{l} = ([\text{ADN}]/\text{Pm}) \times \text{N}$$

donde;

- [ADN]: concentración de ADN determinada por PicoGreen (ng/µl).
- Pm: peso molecular del amplicón calculado en función a su contenido en GC y AT.
- N: número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$).

Los resultados se expresaron como número de copias del gen de interés por cada 10^6 copias del ARNr 18S.

Cuantificación Relativa

En la cuantificación relativa los resultados, normalizados por el ARNr 18S, se expresaron como porcentaje respecto a la abundancia determinada en tejidos donde su expresión fue alta y fácilmente detectable (calibrador) y cuyos niveles se consideraron del 100%.

3.6.6. Electroforesis en gel de agarosa

Geles de agarosa desnaturizantes

Para la preparación del gel se pesó la cantidad de agarosa adecuada para alcanzar la concentración del 1% (p/v) y se disolvió en agua bidestilada. Para facilitar la disolución, la mezcla se calentó hasta ebullición y se mantuvo en agitación constante. Seguidamente, se añadió el tampón MOPS 10x (10% v/v) y el formaldehído al 37% (18% v/v). Cuando la solución se enfrió hasta unos 50°C, se depositó sobre un molde y se colocó el peine adecuado al número de muestras de que se disponían. Una vez polimerizada la agarosa, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis que contenía el tampón de electroforesis MOPS 1x. Las muestras y el marcador de tamaños moleculares de ARN (0,5-10 kb) se mezclaron con un volumen de solución de carga desnaturizante que contenía bromuro de etidio al 0,008% y se calentaron a 75°C

durante 10 min. Antes de cargar las muestras, el gel se sometió a una corriente de 5 V/cm para limpiar las calles.

Todo el material utilizado en la realización de los geles fue convenientemente tratado para eliminar las ARNasas y evitar así la degradación del ARN.

Reactivos utilizados:

- Tampón MOPS 10x: MOPS 0,2 M, acetato sódico anhidro 80 mM, AEDT 10 mM, pH 7.0.
- Solución de carga desnaturizante: formamida 95% (p/v), azul de bromofenol 0,025% (p/v), xileno cianol 0,025% (p/v), AEDT 18 mM y SDS 0,025% (p/v).

Geles de agarosa no desnaturizantes

Para la preparación del gel se pesó la cantidad de agarosa necesaria y se disolvió en TAE para alcanzar el 1% o el 2,5% (p/v) en función de los tamaños moleculares de las muestras a analizar. Para disolver la agarosa, la mezcla se calentó hasta ebullición. Según el caso, se añadió a continuación bromuro de etidio hasta conseguir una concentración de 0,005% (v/v), o se realizó la tinción del gel tras la electroforesis. Una vez que la agarosa hubo polimerizado en un molde con el peine adecuado, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con 0,1 volúmenes de solución de carga antes de depositarse en el gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se emplearon los estándares de 100 pb, 500 pb ó 1 kb, según los casos. Se conectó la cubeta a una fuente eléctrica a una velocidad constante de 80 V. Si el bromuro de etidio se había añadido previo a la electroforesis el gel se llevó a revelar. Cuando el gel no contenía bromuro de etidio, se teñió por inmersión en una solución de TAE con bromuro de etidio 5 µg/ml durante 15 min en agitación y se realizaron dos lavados de 10 min con TAE, antes de visualizar las bandas al UV.

Reactivos utilizados:

- Tampón TAE: trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, AEDT 1 mM, pH 8.
- Solución de carga no desnaturizante: sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v).

3.7. CLONACIÓN DE BCRP HUMANA EN EL VECTOR pSPORT-1 PARA LA SÍNTESIS “IN VITRO” DE SU ARNm

3.7.1. Obtención del ADNc del gen *ABCG2*

La región codificante del gen *ABCG2* se amplificó por RT-PCR convencional. Se utilizó como molde para la RT, el ARN total extraído de células JAr (apartado 3.6.1.) que se retro-transcribió utilizando “oligo-dT” como cebador (apartado 3.6.2.). En la reacción de PCR se usó la enzima de alta fidelidad Accuprime Pfx ADN polimerasa (Invitrogen).

Para amplificar la región codificante de BCRP (“open reading frame”, ORF), se diseñaron dos cebadores según se explica en el apartado 3.6.3. y se utilizó como secuencia diana BC021281, publicada en la base de datos GenBank. Al extremo 5’ de cada cebador se añadió un adaptador que contenía la secuencia para una enzima de restricción. En la tabla 4 se recogen las secuencias de los cebadores (con el adaptador en gris y subrayada la secuencia de la enzima de restricción) así como también las condiciones de temperatura de la PCR.

Tabla 4. Cebadores y condiciones de PCR para amplificar la ORF de BCRP.

Oligonucleótidos	Condiciones para la PCR
Cebador Fwd (5’→3’) TTACAGT <u>CGAC</u> GAGCTCTATTAAGCTGAAAAGATAA SalI	2 min, 95°C 15 seg, 95°C 30 seg, 55°C 2,5 min, 68°C 10 min, 68°C
Cebador Rev (5’→3’) GACGGT <u>GCGGCCGC</u> GAATACTTCAATCAAAGTGCTTC NotI	x40

El producto de la PCR (ADNc de BCRP) se fosforiló utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa (Fermentas), siguiendo las especificaciones del proveedor. Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula de ATP a un grupo OH libre en posición 5’ de una molécula de ADN, ARN u oligonucleótido.

Para purificar el ADNc de BCRP fosforilado se sometió a electroforesis en gel de agarosa no desnaturante al 1%, utilizando en este caso agarosa de bajo punto de fusión, y se realizó la tinción del gel tras la electroforesis (apartado 3.6.6.). Se observó, con UV al 70%, una única banda de 2 kb. El ADN se extrajo del gel y se purificó con el kit comercial “MiniElute Gel Extraction” (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit permite extraer y purificar de una forma rápida y fácil moléculas de ADN de geles de agarosa, además de conseguir un material altamente concentrado. La técnica se basa en la unión del ADN a la membrana de sílica de la columna de extracción en presencia de altas concentraciones de sales y a un pH ácido, y su posterior lavado y elución con los solventes adecuados.

3.7.2. Obtención y propagación del plásmido de origen pGEM-BCRP

El ADNc de BCRP, purificado y fosforilado, se clonó en el vector pGEMt-easy (Promega), siguiendo las especificaciones del proveedor. El primer paso fue añadir una desoxiadenosina 3'-terminal al inserto utilizando la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen). De este modo se obtuvieron los extremos 3' extendidos complementarios a los del vector pGEMt-easy. A continuación, se llevó a cabo la reacción de ligación catalizada por la enzima T4 ADN ligasa, suministrada con el vector, usando la relación molar 3:1 (inserto:vector). La reacción transcurrió durante 12 h a 4°C seguidas de 8 h a 16°C.

Se utilizó 1 µl del producto de la reacción de ligación para transformar mediante choque térmico bacterias *E. coli* DH5α competentes (apartado 3.7.4.). Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina, utilizado como antibiótico de selección, y por α-complementación mediante "screening" blanco/azul (apartado 3.7.4.).

Tras aislar y purificar el plásmido recombinante pGEM-BCRP de las colonias de bacterias transformadas (apartado 3.7.5.), se llevó a cabo un estudio de restricción con la enzima PstI (5 U enzima/ 1 µg ADN plasmídico), para analizar la presencia del inserto. La reacción transcurrió durante 3 h a 37 °C y los productos de la restricción se visualizaron en un gel de agarosa no desnaturizante al 1% teñido con bromuro de etidio tras la electroforesis (apartado 3.6.6.).

Las colonias que resultaron positivas por estudio de restricción se congelaron en glicerol estéril al 80% (p/v) (apartado 3.7.6.) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.7.3. Obtención y propagación del plásmido de destino pSPORT1-BCRP

Para aislar la ORF de BCRP del vector de origen y generar los extremos 5'-cohesivos complementarios a los del vector de destino, pSPORT, se llevó a cabo una restricción secuencial del plásmido pGEM-BCRP utilizando primero la enzima NotI (Promega) y a continuación, la endonucleasa SalI (Amersham). Las reacciones transcurrieron a 37 °C durante 3 h y se usaron 5 U de enzima por cada 1 µg de ADN a digerir. Después de cada restricción se separaron los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (apartado 3.6.6.) y se extrajo y purificó el ADN del gel con el kit comercial "MiniElute Gel Extraction" (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

A partir del plásmido recombinante pSPORT1-OATP1A2 (cedido generosamente por los Drs. Peter Meier, Bruno Hagenbuch y Bruno Stieger del Hospital Universitario de Zurich, Suiza) se obtuvo el vector de destino pSPORT con los extremos cohesivos complementarios para la clonación direccional del ADNc de BCRP respecto al

promotor T7, para la síntesis in vitro de su ARNm. Para ello, se extrajo la ORF de OATP1A2, clonada entre los sitios SalI y NotI (en los extremos 5' y 3' del inserto, respectivamente), mediante la digestión del plásmido recombinante con estas dos enzimas de restricción (5 U de cada enzima/ µg de ADN). La reacción se realizó a 37 °C durante 3 h. El vector pSPORT se separó del resto del plásmido recombinante mediante electroforesis en gel de agarosa del 1% y se purificó con el kit comercial "MiniElute Gel Extraction" (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

A continuación, la enzima ADN ligasa (Promega) catalizó la reacción de ligación entre el ADNc de BCRP, purificado del vector de origen, y el vector de destino, pSPORT1, usando la relación molar 5:1 (inserto:vector). La reacción transcurrió durante 24 h a 16°C.

Para la propagación del plásmido recombinante de destino pSPORT1-BCRP, se transformaron, mediante choque térmico (apartado 3.7.4.), bacterias *E. coli* DH10B competentes utilizando 5 µl del producto de la reacción de ligación. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina, utilizado como antibiótico de selección.

Para analizar la presencia del inserto, se digirió el plásmido pSPORT1-BCRP, con las enzimas PstI y SphI (Amersham), una vez aislado y purificado de los transformantes (apartado 3.7.5.). Se utilizaron 5 U de cada enzima por cada 1 µg de ADN plasmídico. La reacción se llevó a cabo durante 3 h a 37 °C y los productos de la restricción se visualizaron en un gel de agarosa no desnaturalizante al 1% teñido con bromuro de etidio tras la electroforesis (apartado 3.6.6.).

Las colonias que contenían el plásmido pSPORT1-BCRP con la ORF de BCRP correctamente orientada respecto al promotor T7, se congelaron en glicerol estéril al 80% (p/v) (apartado 3.7.6.) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La ausencia de mutaciones en el ADNc de BCRP clonado se confirmó por secuenciación (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca).

3.7.4. Transformación mediante choque térmico de bacterias competentes

Sobre 50 µl de suspensión de bacterias competentes se añadió 1 µl del plásmido pGEM-BCRP o 5 µl del plásmido pSPORT1-BCRP. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Para facilitar la internalización de los plásmidos se sometió a las bacterias a un choque térmico que consistió en elevar la temperatura de la mezcla y volver a bajarla rápidamente. Para ello se incubaron en un baño a 42 °C durante 2 min e inmediatamente se enfriaron en hielo durante 2 min. Se añadieron entonces 500 µl de medio SOC frío y se incubaron a 37 °C durante 1 h en agitación.

Tanto los plásmidos recombinantes, pGEM-BCRP y pSPORT1-BCRP, como las cepas de *E.coli* que se usaron, permiten la selección de los transformantes por “screening” blanco/azul en placas suplementadas con el inductor del promotor lacZ IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosido) y el sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) que al ser hidrolizado por la enzima β -galactosidasa da un precipitado azul insoluble en agua cuando se ha producido la α -complementación y las bacterias han adquirido los vectores circularizados sin el ADN foráneo. De tal modo que las bacterias transformadas con los plásmidos recombinantes darán lugar a colonias blancas ya que no regeneran la actividad β -galactosidasa porque tienen interrumpida la región codificante de la enzima por el ADNc de BCRP.

Para seleccionar los transformantes, se sembraron 200 μ l de bacterias en placas de LB-Agar suplementadas con ampicilina/IPTG/X-Gal y se incubaron a 37 °C durante 12 h. Se seleccionaron las colonias blancas, bien definidas y aisladas.

Reactivos:

- Medio Luria-Bertani (LB): triptona 10 g/l, extracto de levaduras 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7. El medio LB para las placas Petri contenía, además, 15 g/l de agar y 100 μ g/ml de ampicilina. Para la selección blanco/azul se añadieron sobre las placas con ampicilina, 100 μ l de IPTG (100 mM) y 100 μ l de X-Gal (10 mg/ml) y se dejaron absorber en la placa a 37 °C durante 30 min antes de su uso.
- Medio SOC: triptona 20 g/l, extracto de levaduras 5 g/l, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 200 g/l, $MgSO_4$ 240 g/l, glucosa 20 mM, pH 7.

3.7.5. Obtención y purificación del ADN plasmídico de bacterias transformantes

Para purificar el ADN plasmídico se utilizó el kit comercial “QIAprep Spin Miniprep” (QIAGEN) que se basa en aplicar el lisado de bacterias transformantes, obtenido en condiciones alcalinas, sobre una columna constituida por una resina de intercambio iónico.

Colonias individuales de bacterias transformadas seleccionadas en placas LB-agar crecieron a 37°C en 5 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) durante 12-16 h en agitación.

La suspensión de bacterias transformadas se centrifugaron a 8000 xg, durante 2 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en un tampón que contenía ARNasa A, para eliminar el ARN de *E. coli* contaminante, y se añadió una solución detergente alcalina para romper las células y desnaturalizar las moléculas de ADN cromosómicas y plasmídicas, así como también las proteínas. A continuación se neutralizó el lisado y se ajustó las condiciones de alta salinidad adecuadas para la adsorción del ADN a la

membrana la columna de extracción, añadiendo un tampón que contenía sales caotrópicas (hidrocloruro de guanidina) y ácido acético. Después de centrifugar el lisado, se añadió el sobrenadante a la columna. A continuación se realizaron dos lavados sucesivos, donde se eliminaron las endonucleasas y las sales. Finalmente, el ADN plasmídico se eluyó de las columnas, en condiciones de baja salinidad, en un tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.5. La concentración de ADN se calculó por el método de PicoGreen (apartado 3.11.2.).

3.7.6. Congelación de bacterias transformantes

Una vez identificados los clones positivos, se hizo un “stock” en glicerol de los mismos. Para ello, las bacterias transformantes crecieron en 5 ml de LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C y en agitación, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5-0,7 UAA a 600 nm. Entonces, se mezclaron en criotubos, 0,75 ml del cultivo con 0,3 ml de glicerol al 80% estéril y se congelaron inmediatamente por inmersión en N₂ líquido. Los viales de bacterias se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.8. SÍNTESIS *IN VITRO* DE ARNm DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

Para la síntesis *in vitro* del ARNm de los transportadores de aniones orgánicos de rata Oatp1a1, Oatp1a4 y Oatp1b2 y de las bombas ABC Bsep y Mrp2 de rata y BCRP humana, se empleó el kit comercial “mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra” (Ambion), siguiendo las especificaciones del proveedor. En la tabla 5 se recogen los plásmidos recombinantes que contienen la ORF de estas proteínas correctamente orientada para la transcripción *in vitro* a partir del promotor T7, así como también el sitio de clonación y el tamaño del ARNm sintetizado de cada transportador.

Tabla 5. Plásmidos recombinantes utilizados en la síntesis *in vitro* de ARNm.

Plásmido recombinante	Tamaño del plásmido recombinante (pb)	Sitio de clonación (5'→3')	Endonucleasa (Linealización)	Tamaño del ARNm sintetizado (pb)
pSPORT1-Oatp1a1	6853	SalI → NotI	XbaI	2744
pSPORT1-Oatp1a4	7728	SalI → NotI	NotI	3619
pSPORT1-Oatp1b2	6647	NcoI → HindIII	HindIII	2538
pSPORT1-Bsep	9194	SpeI → NotI	HindIII	5085
pKEH1-Mrp2	9774	EcoRI → EcoRI	XbaI	4974
pSPORT1-BCRP	6143	SalI → NotI	NotI	2034

Los plásmidos recombinantes pSPORT1-Oatp1a1, pSPORT1-Oatp1a4, pSPORT1-Oatp1b2, pSPORT1-Besp y pKEH1-Mrp2 fueron cedidos generosamente por los Drs. Peter Meier, Bruno Hagenbuch y Bruno Stieger del Hospital Universitario de Zurich (Suiza).

De acuerdo con las indicaciones del kit, el primer paso para la síntesis *in vitro* del ARNm a partir de ADN plasmídico es la linealización del plásmido recombinante en el extremo 3' de la ORF. De este modo se evita generar transcritos heterogéneos y extremadamente largos debido a la alta procesividad de la polimerasa del fago T7. En la tabla 5 está indicada la enzima de restricción escogida en cada caso para la linealización. La reacción se llevó a cabo utilizando 10 U de enzima por cada 1 µg de ADN plasmídico a 37°C durante 6 h.

Para eliminar la endonucleasa de restricción del ADN molde, se realizó un tratamiento con la enzima proteinasa K (Roche), una serín proteasa no específica que elimina proteínas contaminantes de ácidos nucleicos. Se utilizaron 200 µg/ml de la enzima y la reacción transcurrió a 50°C durante 30 min. El material se purificó por extracción fenol:cloroformo, seguida de precipitación con etanol y acetato sódico 3 M.

Una vez libre de contaminantes, se usaron de 0,5 a 1 µg del ADN plasmídico linealizado para la síntesis *in vitro* del mensajero. La reacción transcurrió a 37°C durante 2 h. Durante este tiempo se transcribió la ORF del gen a partir del promotor T7 dando lugar a moléculas de ARNm con Caperuza de metil-GTP en 5'. Para evitar la aparición de transcritos truncados durante la síntesis del ARNm de BCRP fue necesario utilizar la proteína T4 Gene 32 (Ambion), una proteína de unión a ADN de hebra sencilla (single-strand binding protein, SSB) (Ben Aziz and Soreq, 1990).

Una vez finalizada la transcripción, se eliminó el ADN molde por tratamiento con ADNasa I. Para hacer más estable a los mensajeros y mejorar su tasa de traducción, el kit incorpora un último paso para la adicción de la cola de poli(A) utilizando una polimerasa poli(A) de *E. coli* y ATP. Para finalizar, el ARNm sintetizado se purificó por extracción con fenol:cloroformo y se precipitó con etanol y acetato sódico 3 M. A continuación, el precipitado, secado en un "speed vacuum", se resuspendió en 15 µl de TE (AEDT 1 mM y Tris 10 mM, pH 8.0) y se cuantificó por el método del RiboGreen (apartado 3.12.1). Por último, el tamaño molecular de los productos de la transcripción *in vitro* (ver tabla 5) se confirmó por electroforesis en un gel desnaturalizante al 1% (p/v) (apartado 3.6.6.).

Todo el material utilizado en este apartado estuvo libre de ARNasas.

3.9. EXPERIMENTOS EN OOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

Para los estudios funcionales de transportadores de membrana se utilizó el modelo de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de rana *Xenopus laevis*. Previo a la realización de los experimentos, los oocitos se extrajeron y se seleccionaron para la microinyección del ARNm sintetizado *in vitro* de la o las proteínas objeto de estudio.

3.9.1. Extracción y selección de los oocitos

Las ranas se anestesiaron por inyección intramuscular de 0,1 ml de ketamina. El animal se colocó sobre hielo, y se abrió una pequeña incisión de aproximadamente 1 cm en un lateral en la parte inferior del abdomen. Se extrajeron los racimos de oocitos con unas pinzas delgadas, se cortaron y se introdujeron en medio OR-2. Una vez finalizada la extracción, se cerró la incisión del abdomen con sutura continua en la capa muscular y con dos puntos individuales en “U” en la piel.

Para disgregar los oocitos y eliminar la gelatina folicular, se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con 2 mg/ml de collagenasa disuelta en medio OR-2. Se observó entonces el estado de madurez de los oocitos y se seleccionaron los que se encontraron en el estadio 6 de maduración que presentaban una región parda y otra amarillenta, separadas por una banda blanquecina. Los oocitos más maduros, en el estadio 7, pierden esta banda blanca y no son adecuados para los estudios de captación.

Otro criterio de calidad fue la ausencia de deformaciones. En la selección, se eliminaron los oocitos lisados, los inmaduros más pequeños y los demasiado maduros. Los oocitos sanos seleccionados se incubaron a 18°C en medio Barth hasta que se realizó la inyección del ARN. En la figura 1 se muestra una imagen de oocitos de *X. laevis* en distintos estadios de maduración.

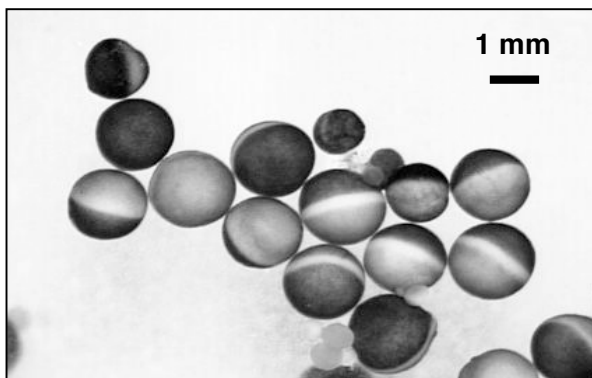


Figura 1. Imagen de oocitos de *X. laevis* extraídos y disgregados.

Reactivos utilizados:

- Medio Barth: NaCl 88 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, Hepes 15 mM, KCl 1 mM, Ca(NO₃)₂ 0,3 mM, CaCl₂ 0,41 mM, MgSO₄ 0,82 mM, gentamicina 50 mg/l, pH 7,6. El medio Barth se suplementó con una mezcla de antibióticos y antimicóticos al 1% (20 U/ml penicilina, 0,02 mg/ml estreptomicina y 0,05 µg/ml anfotericina B).
- Medio OR-2: NaCl 82,5 mM, Hepes 5 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, pH 7,8.

3.9.2. Microinyección del ARNm en los oocitos

Los capilares para inyectar el ARN se obtuvieron por separación, tras calentamiento, de tubos de microhematocrito. Antes de su utilización, se cortó con unas tijeras la punta de cada capilar para asegurarse que no estuviese cerrada. A continuación, el capilar se llenó de aceite de parafina y se montó en el microinyector Nanoliter 2000 (WPI), evitando generar burbujas, y se cargó el capilar con 2 µl del ARN disuelto en TE libre de ARNasas. Entonces, los oocitos seleccionados se colocaron sobre una placa de inyección que tenía una rejilla en el fondo para inmovilizarlos. De este modo, se facilitó su inyección bajo una lupa.

Los oocitos se inyectaron uno a uno con el volumen necesario para conseguir en el interior del oocito la cantidad deseada de ARN cargado en el microinyector. El volumen de inyección se mantuvo constante entre los distintos grupos de oocitos y se ajustaron las diferencias de volumen con TE libre de ARNasas.

Para la expresión de un transportador de membrana en ausencia de ortólogos, cada oocito se inyectó con 7 ng del ARNm sintetizado *in vitro* (18-21 nl/oocito).

Para la coexpresión de Oatp1a1 con las bombas ABC, BCRP, Bsep o Mrp2, cada oocito se inyectaron con 36-42 nl de una mezcla del ARNm de Oatp1a1 con el ARNm de la bomba ABC, para inyectar 7 ng de cada uno (relación 1:1) o 4 ng del ARNm de Oatp1a1 y 12 ng del ARNm de la bomba ABC (relación 1:3) por oocito.

Tras la inyección, los oocitos se incubaron en medio Barth durante 2 días, tiempo en que según experimentos previos la expresión de las proteínas transportadoras fue óptima. Diariamente, se retiraron los oocitos deteriorados y se reemplazó el medio Barth por medio fresco.

3.9.3. Estudios funcionales de los transportadores de membrana en los oocitos

Antes de comenzar los experimentos, los oocitos se lavaron 3 veces con solución de captación sin sustrato y se separaron en grupos de 10 oocitos por condición experimental.

Se realizaron dos tipos de experimentos. En los experimentos de carga los oocitos, que expresaban sólo una isoforma de Oatp o que co-expresaban Oatp1a1 junto con una bomba ABC, se incubaron con 100 µl de la solución de captación que contenía la concentración adecuada del sustrato cuyo transporte se quería determinar. En los experimentos de eflujo los oocitos, que expresaban sólo una bomba ABC (BCRP o Bsep), se cargaron directamente por microinyección individual con 50 nl de solución de captación conteniendo la cantidad adecuada del sustrato y de la [³H]-inulina, utilizada para determinar la salida inespecífica del compuesto a través del poro producido al microinyectar los compuestos. El eflujo se determinó al transferir los oocitos cargados por microinyección a 1 ml de solución de captación sin sustrato e incubarlos durante el tiempo estipulado.

En todos los casos, un grupo de oocitos no inyectados con el ARNm de los transportadores (silvestres) se incubaron en paralelo y se utilizaron para determinar el transporte inespecífico.

Todas las incubaciones se realizaron a 25°C durante el tiempo estipulado, en presencia o en ausencia de inhibidores.

Para parar el transporte, los oocitos se lavaron 4 veces sucesivas con 4 ml de solución de captación sin sustrato enfriada en hielo. A continuación, se procesaron para la determinación del contenido intracelular de los diferentes compuestos. Cuando se trató de compuestos radiactivos, los oocitos se digirieron con 200 µl de SDS al 0,5% (p/v) durante al menos 2 h, antes de añadir líquido de centelleo (apartado 3.12.6.). En el caso de compuestos fluorescentes, los oocitos se procesaron y se digirieron tal y como se explica en el apartado 3.12.5. La determinación del contenido celular de ácidos biliares no marcados radiactivamente se hizo por LC-MS-MS (apartado 3.12.10.).

La captación neta mediada por transportadores de carga se calculó como la diferencia del contenido celular de los oocitos que expresaban el transportador menos el contenido encontrado en los oocitos silvestres (captación inespecífica) al final del periodo experimental.

Para determinar el eflujo mediado por una bomba ABC en los experimentos de co-expresión, se calculó la diferencia del contenido celular de los oocitos que expresaban sólo el transportador de carga (Oatp1a1) menos el contenido intracelular de los oocitos que co-expresaban Oatp1a1 junto con la bomba ABC al final del periodo experimental.

El transporte mediado por las bombas ABC en los experimentos de eflujo, expresado como porcentaje, se calculó como la diferencia de la cantidad de sustrato inyectada en los oocitos que expresaban el transportador al inicio del experimento (100 %) menos el contenido celular retenido al final del periodo experimental.

Soluciones utilizadas:

- Solución de captación sin sodio: cloruro de colina 100 mM, Hepes 10 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,5 ajustado con trizma base 1 M.
 - Sustratos utilizados (experimentos de carga): [³H]-TC 50 μM y BV 100 μM en presencia o en ausencia de 17β-glucurónido de estradiol (17βGE) 100 μM.
- Solución de captación con sodio: NaCl 100 mM, Hepes 10 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,5 ajustado con trizma base 1 M.
 - Sustratos utilizados (experimentos de carga): [³H]-AC 50 μM, [¹⁴C]-GC 50 μM, [³H]-TC 50 μM, TLC 5 μM, TSLC 50 μM, [³H]-17βGE 10 μM, Hoechst-33342 200 μM y [³H]-mitoxantrona ([³H]-MX) 10 μM, en presencia o en ausencia de fumitremorgina C (FTC) 5 μM.
 - Sustratos utilizados (experimentos de eflujo): [¹⁴C]-TSLC 300 μM junto con [³H]-inulina 100 μM.

3.9.4. Efecto de esteroides colestáticos sobre el transporte mediado por BCRP en los oocitos

Dos grupos de experimentos se realizaron para determinar el efecto inhibitor del esteroide colestático 17βGE sobre el transporte mediado por BCRP. Por un lado se realizaron experimentos de carga donde los oocitos que expresaban la bomba se incubaron en 100 μl de medio de captación que contenía el sustrato en presencia o en ausencia de este esteroide colestático.

Por una parte, se realizaron experimentos de eflujo. Para investigar el efecto cis-inhibidor del 17βGE los oocitos se cargaron directamente por microinyección individual con 50 nl del sustrato diluido en solución de captación en ausencia o en presencia del esteroide colestático, antes de incubarlos en 1 ml de medio libre del sustrato y del inhibidor. Para determinar la salida inespecífica del compuesto a través del agujero dejado por el capilar de microinyección, se microinyectó [³H]-inulina junto con el sustrato.

Para determinar el efecto trans-inhibidor del 17βGE sobre la actividad de BCRP, los oocitos también se cargaron con el sustrato directamente por microinyección

individual, pero en este caso el esteroide colestático se añadía o no al medio de eflujo donde se incubaron posteriormente los oocitos.

Como control positivo, en los experimentos de eflujo se utilizaron en paralelo oocitos que expresaban Bsep.

En todos los casos, las incubaciones se realizaron a 25°C durante 1 h y para determinar el transporte inespecífico se incubaron conjuntamente oocitos silvestres.

Soluciones utilizadas:

- Solución de captación con sodio: NaCl 100 mM, Hepes 10 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,5 ajustado con trizma base 1 M.
 - Sustratos utilizados (experimentos de carga): [³H]-mitoxantrona ([³H]-MX) 10 µM, en presencia o en ausencia de FTC 5 µM o de 17βGE 50 µM, como inhibidores del transporte.
 - Sustratos utilizados (experimentos de eflujo): [¹⁴C]-TSLC 150 µM en presencia (efecto cis-inhibidor) o ausencia de 17βGE 750 µM. Para determinar el efecto trans-inhibidor el medio de eflujo contenía 17βGE 50 µM.

3.10. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

3.10.1. Obtención de las muestras

Homogenados tisulares

Los fragmentos de tejidos (placenta, hígado materno e hígado fetal de rata) almacenados a -80°C, se pesaron y se cortaron en pequeños trozos de aproximadamente 50 mg con un bisturí limpio, evitando la descongelación durante el proceso. Cada trozo de tejido congelado, se dejó descongelar sobre hielo en buffer RIPA suplementado con el 1% (v/v) del cóctel de inhibidores de proteasas (3 ml RIPA/g de tejido). Una vez descongelado, se homogeneizó con un politrón durante 1 min a mínima potencia y a 4°C. Posteriormente, el homogenado se incubó durante 30 min sobre hielo y a continuación, se centrifugó dos veces a 500xg durante 10 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante (homogenado tisular) se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Lisados de células WIF-B9 y WIF-B9/R

Las células se cultivaron en placas de 6 cm de diámetro tal y como se describe en el apartado 3.5. Una vez el cultivo alcanzó la confluencia deseada, se retiró el medio y la placa se lavó varias veces con PBS a temperatura ambiente. A continuación se añadió el volumen necesario de buffer RIPA suplementado con 1% (v/v) del cóctel de inhibidores de proteasas para cubrir toda la superficie de la placa (250 µl/placa) y se incubaron las células durante 25 min sobre hielo. Transcurrido este tiempo, la superficie de la placa se raspó utilizando un raspador de células y el lisado celular se transfirió a un tubo eppendorf y se incubó durante 20 min más sobre hielo. Ocasionalmente, se agitaba el lisado en un vortex. Finalmente, el lisado se centrifugó durante 20 min a máxima velocidad a 4°C y el sobrenadante se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Crudos de membrana

Para obtener el crudo de membrana de trofocitos asilados de placenta humana a término las células se cultivaron y tripsinizaron tal y como se describe en el apartado 3.5. Tras precipitar las células y eliminar los restos de tripsina, éstas se resuspendieron en 2 ml de tampón H frío suplementados con el cóctel inhibidor de proteasas (1%, (v/v)). Los fragmentos de hígado o placenta humana almacenados a -80°C, se cortaron en pequeños trozos de aproximadamente 50 mg y se resuspendieron en el mismo volumen de tampón H frío con inhibidores de proteasas. Las muestras se homogeneizaron en el politrón durante 15 seg y se centrifugaron a 200000xg durante 90 min a 4°C. Cada precipitado se resuspendió en aproximadamente 200 µl de tampón H con inhibidores de proteasas, se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Soluciones utilizadas:

- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄-12H₂O 0,5 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7.4.
- Tampón RIPA: PBS 1x, nonidet 1% (p/v), desoxicolato sódico 0,5% (p/v), SDS 0,1% (p/v).
- Tampón H: sacarosa 250 mM, AEDT 0,5 M, CaCl₂ 0,2 mM, Hepes-Tris 100 mM, pH 7.4.

3.10.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Preparación de los geles

La electroforesis vertical se llevó a cabo en geles de poliacrilamida del 7.5% (p/v) en Tris-HCl. Para preparar el gel de resolución se mezclaron 2,4 ml del tampón Tris 1,5 M pH 8.8, 0,4 ml de SDS 10% (p/v), 5 µl de TEMED, 20 µl de persulfato de amonio 25% (p/v), la cantidad adecuada de poliacrilamida según el porcentaje del gel, y agua hasta un volumen de 10 ml. La mezcla se depositó en el soporte previamente montado del sistema “Mini-Protean II Cell” y se dejó polimerizar durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Se protegió del aire añadiendo isobutanol saturado en agua.

Una vez polimerizado el gel, se retiró el isobutanol y la superficie del gel en contacto con el aire se lavó con agua destilada. Se preparó entonces el gel concentrador mezclando 1 ml del tampón Tris 0,5 M pH 6.8, 160 µl del SDS 10%, 6 µl de TEMED, 12,5 µl del persulfato de amonio 25%, poliacrilamida y agua hasta un volumen de 4 ml. Se depositó sobre el gel separador y se introdujo el peine adecuado, evitando crear burbujas, según el número de muestras que se deseara cargar en él. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 30 min.

Preparación de las muestras

La concentración de proteínas de las muestras se determinó por el método de Markwell (Markwell et al., 1978)(apartado 3.11.4.). Las muestras se trataron añadiendo un volumen de 0,125 M Tris-HCl pH 6.8 conteniendo SDS 4.6% (p/v), 0,025 µl de 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol al 4% (p/v) y 0,05 volúmenes de glicerol. Se incubaron durante 3 min en un baño de agua hirviendo.

Condiciones de la electroforesis y de la transferencia

Se realizó la electroforesis, en una cubeta con tampón de migración, a una corriente constante de 10 mA para el gel concentrador, incrementándose a 20 mA para el gel separador o de resolución.

La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó en una cubeta con tampón de transferencia, a una corriente de 15 V durante toda la noche a 4°C y en agitación constante.

Para comprobar que las proteínas se encontraban en la membrana tras la transferencia, ésta se tiñó con el colorante rojo ponceau durante 5 min. Esta tinción también permite valorar la carga de proteínas en cada calle.

Soluciones utilizadas:

- Tampón de electroforesis: Tris 0,025 M, L-glicina 0,192 M y 1% SDS.

- Tampón de transferencia: Tris 0,025 M, L-glicina 0,192 M y metanol 20% (v/v), pH 8.3.
- Rojo ponceau: 0,1% (p/v) en ácido acético al 5%.

3.10.3. Inmunodetección

La membrana se sometió al siguiente procedimiento a temperatura ambiente: se realizaba el bloqueo durante 1 h con leche descremada al 5% (p/v) en PBS-T en agitación. Acto seguido se lavó la membrana con PBS-T en agitación durante 5 min, y se incubó durante 1-2 h con el anticuerpo primario correspondiente, también en agitación continua. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios diluidos en leche descremada al 1% (p/v) en PBS-T (tabla 6).

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por Western blot.

Nombre	Antígeno	Especie de origen	Dilución utilizada	Procedencia
OSA-400	Bvr α	conejo	1:5000	Stressgen Bioreagent
Usal-hBSEP-McAb-1	BSEP	ratón	1:50	Alexis
BXP21	BCRP	ratón	1:500	Alexis
6C5	GAPDH	ratón	1:1000	Santa Cruz
DM 1A	α -tubulina	ratón	1:5000	Sigma-Aldrich

Tras lavar la membrana con PBS-T (4 lavados de 15 min, en agitación), se incubó durante 1 h en agitación con el anticuerpo secundario adecuado marcado con peroxidasa y diluido en leche descremada al 5% (p/v) en PBS-T según las indicaciones del proveedor. A continuación se procedió de nuevo al lavado de la membrana con PBS-T en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Se eliminó el exceso de tampón PBS-T y se procedió a la detección mediante incubación de la membrana durante 1 min, sin agitación, con los reactivos de detección ECL 1 y 2 mezclados a partes iguales (volumen requerido, 0,125 ml/cm²). Se eliminó el exceso de reactivos 1+2, se envolvió la membrana en papel de plástico y se expuso a una película de autorradiografía el tiempo necesario para encontrar una señal detectable con el menor ruido de fondo.

Soluciones utilizadas:

- Tampón PBS-T: PBS suplementado con 0,5% (v/v) de Tween-20.
- Reactivos de detección ECL (Enhanced ChemioLuminescence) de la casa comercial GE Healthcare, que incluye los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2.

3.11. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.11.1. Obtención de muestras

Cortes de tejidos y de oocitos

Los fragmentos de tejido se congelaron inmediatamente tras su obtención por inmersión en N₂ líquido y a continuación las muestras se almacenaron a -80°C.

Los oocitos de rana *X. laevis* se procesaron siguiendo el método descrito previamente por Nakanishi (Nakanishi et al., 2003). Brevemente, dos días después de inyectar el ARNm de interés en los oocitos, grupos de seis oocitos se lavaron tres veces con PBS para eliminar los restos del medio de incubación (Barth) donde se encontraban. A continuación se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min sobre hielo. Tras lavar de nuevo con PBS, los oocitos se transfirieron a un tubo que contenía 1 ml de sacarosa al 30% (p/v) en PBS y se mantuvieron a 4°C durante 12 h. Una vez embebidos en la sacarosa, los oocitos se congelaron en OCT sobre isopentano frío y se almacenaron a -80°C.

Los cortes de tejidos y de oocitos de 5 µm se realizaron en un criostato a una temperatura entre -20°C y -15°C y se colocaron en portas, que se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

Células en cultivo

Para el marcaje por inmunofluorescencia las células se sembraron en cubres estériles dentro de placas de cultivo de 3 cm de diámetro con 2 ml de medio de cultivo y se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaban entre el 60 y el 80% de confluencia.

3.11.2. Inmunodetección

Las muestras se fijaron con metanol frío durante 3 min, y tras 3 lavados rápidos, se realizó un bloqueo con suero bovino fetal al 10% en PBS durante 30-40 min.

La incubación con los primeros anticuerpos diluidos en PBS con 5% de suero bovino fetal se realizó a temperatura ambiente durante 1 h. La tabla 7 muestra las diluciones de los anticuerpos primarios utilizados en este estudio:

A continuación se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y se llevó a cabo la incubación, durante 1 h en oscuridad, con los anticuerpos secundarios apropiados en cada caso anti-IgG de ratón, conejo o cabra conjugados con Alexa 488[®] ó Alexa 594[®] (diluidos 1:1000) y Dapi para teñir los núcleos (diluido 1:5000).

Tras tres lavados con PBS de 10 min, se realizó el montaje con Dako Fluorescent Mounting Medium. Se colocó el cubre objetos y se selló con laca de uñas. La visualización del marcaje se realizó con un microscopio confocal.

Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por inmunofluorescencia.

Nombre	Antígeno	Especie de origen	Dilución utilizada	Procedencia
RCK105	CK7	ratón	1:100	Santa Cruz
C19	Ve-Cad	cabra	1:200	Santa Cruz
Anti-CD163	CD163	ratón	1:50	Serotec MCA
MAB1682	α SMA	ratón	1:200	Chemicon I.
ESL	OATP1B1	conejo	1:50	Dr. R. Kubitz
SkT	OATP1B3	conejo	1:100	Dr. R. Kubitz
SPA	OATP2B1	conejo	1:200	Dr. R. Kubitz
C494	MDR1	ratón	1:50	Alexis
MRPm6	MRP1	rata	1:20	Alexis
M₂III₆	MRP2	ratón	1:25	Alexis
M₃II₉	MRP3	ratón	1:20	Alexis
SNG	MRP4	conejo	1:50	Dr. R. Kubitz
K168	BSEP	conejo	1:25	Dr. R. Kubitz
BXP34	BCRP	ratón	1:20	Alexis
M7-PB-E9	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	ratón	1:100	Abcam
Anti-ZO-1	ZO-1	rata	Sin diluir	Dra. D. Cassio
EAG15	Mrp2	conejo	1:200	Dra. D. Cassio

Dr. R. Kubitz, Universidad Heinrich Heine (Düsseldorf, Alemania); Dra. D. Cassio del INSERM (París, Francia).

3.11.3. Controles negativos

Para comprobar la especificidad de la técnica de inmunofluorescencia se llevaron a cabo los siguientes controles negativos:

- Omisión de los anticuerpos primarios para detectar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios.
- Omisión de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia para detectar autofluorescencia de las muestras o de los anticuerpos primarios.
- En los casos de doble marcaje, incubación de cada anticuerpo primario con el secundario del otro anticuerpo primario para detectar uniones cruzadas.

3.12. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.12.1. Valoración del ARN por el método del RiboGreen

El ARN total se valoró por fluorimetría, utilizando el método comercial “RiboGreen RNA Quantification kit”. La técnica se basa en la unión específica de un fluorógeno (RiboGreen) al ARN, el cual emite fluorescencia de forma proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra. Las muestras se diluyeron convenientemente en tampón TE 1x, pH 7.5. Se realizó una recta patrón con ARN ribosomal estándar 100 µg/ml comprendida entre 0 y 100 ng. Se añadió el reactivo RiboGreen diluido 1:400 a las muestras y a los puntos de la recta patrón. Se agitaron las mezclas y se protegieron de la luz durante 5 min, tras los cuales se midió la fluorescencia en un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 500 nm y de emisión de 525 nm.

3.12.2. Valoración del ADN por el método del PicoGreen

Para cuantificar la cantidad de ADN de doble cadena se utilizó el método comercial “Pico-Green DNA-Quantitation Kit”. La técnica es similar a la descrita anteriormente para el ARN y se basa en la unión de un grupo fluorógeno al ADN, el cual emite una señal proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. Las muestras se diluyeron convenientemente en TE 1x, según los casos. Se realizó una recta patrón con el ADN de doble cadena 100 µg/ml comprendida entre 0 y 100 ng (250 µl de cada dilución). Se añadieron 250 µl del reactivo PicoGreen diluido 1:400 a las muestras y a los puntos de la recta patrón. Se agitaron las mezclas y se protegieron de la luz durante 5 minutos, tras los cuales se midió la fluorescencia en un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 502 nm y 523 nm de emisión.

3.12.3. Determinación de la viabilidad celular

Test de Formazán

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. El formazán, soluble en medios acuosos, se forma a partir de sales de tetrazolio por la acción de deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas (Marshall et al., 1995). Se puede cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de formazán producido ya que es un compuesto que absorbe a 490 nm, lo que es directamente proporcional al número de células vivas.

Terminado el periodo experimental descrito en el apartado 3.5., las células se incubaron durante 90 min, respectivamente, en presencia de la mezcla MTS:PMS (1:20) a 37°, en una estufa con atmósfera del 5% CO₂ y humedad relativa del 80%.

Transcurrido este tiempo se determinó la intensidad del color existente en el sobrenadante por espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm, en el lector de ELISA. Como blanco se usó medio de cultivo en varios pocillos que habían sido incubados de igual forma que las demás placas.

El resultado se expresa como porcentaje de formazán en los pocillos en las diferentes condiciones experimentales respecto a los controles. Para ello se compara la densidad óptica obtenida en las placas expuestas a las distintas concentraciones de los compuestos con la correspondiente a las placas control.

Reactivos utilizados:

- Kit “CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” que contiene metasulfato de fenazina (PMS) y sal de tetrazolio (MTS).

Test de Rojo Neutro

La determinación de la viabilidad celular se realizó por una modificación del método de Fautz (Fautz et al., 1993), que está basado en la capacidad de las células vivas de acumular rojo neutro (RN) en sus lisosomas y aparato de Golgi.

Tras aspirar el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS estéril a 37°C y se les añadió 1 ml de la disolución de RN 50 µg/ml. Se incubaron durante 90 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se aspiró el RN y las células se lavaron 2 veces con PBS a 37°C. Posteriormente, se añadió 0,5-1 ml de medio de elución, para extraer del interior de las células el RN que había sido incorporado por las células vivas. Tras 10 min a temperatura ambiente, se determinó la intensidad del color existente en el medio de elución por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. Como blanco se usó el medio de elución de una placa sin células a la que se le había añadido el RN y que había sido incubada de igual forma que las demás placas.

El resultado se expresa como porcentaje de RN retenido respecto a las células control, obtenido por comparación de la densidad óptica de las células tratadas con las distintas concentraciones de paracetamol con las correspondientes células control.

Soluciones utilizadas:

- Solución de RN 50 µg/ml en PBS estéril.
- Medio de elución (ácido acético 50% v/v y etanol 1% v/v).

3.12.4. Determinación de proteínas

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry (Lowry et al., 1951) realizada por Markwell (Markwell et al., 1978).

En cada tubo de ensayo se añadieron 240 µl de agua destilada, 10 µl de muestra problema diluida según conveniencia y 750 µl de reactivo C. Se agitaron e incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 75 µl de reactivo Folin Ciocalteu al 50% en agua destilada y se volvieron a agitar. Por último, se incubaron 45 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Transcurrido ese tiempo se procedió a la lectura espectrofotométrica de la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm.

Para calcular la concentración de proteínas presente en las muestras, se elaboró una recta patrón utilizando una solución madre de BSA con un rango de concentraciones de: 12,5, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 µg/ml. La concentración final de proteínas, una vez tenidas en cuenta las diluciones realizadas, se expresó en mg/ml.

Reactivos utilizados:

- Reactivo A: Na₂CO₃ 2% (p/v), NaOH 0,4% (p/v), tartrato disódico 0,16% (p/v) y SDS 1% (p/v).
- Reactivo B: CuSO₄ 4% (p/v).
- Reactivo C: mezcla de los reactivos A y B en proporción 100:1 (A:B).
- Reactivo Folin-Ciocalteu: dilución del preparado comercial Folin al 50% (v/v) en agua destilada.
- Solución estándar de proteínas: albúmina sérica bovina (fracción V, Sigma) 0,0025% (p/v) en agua destilada.

3.12.5. Determinación de compuestos fluorescentes en células

Contenido de FITC/CGamF en células

Las células se digirieron por incubación con 1 ml de SDS al 10% (p/v) durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadieron 2 ml de PBS en la placa y se raspó con una espátula. Se midió la fluorescencia a unas longitudes de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 530 nm.

Contenido de Hoechst-33342 en oocitos de *X. laevis*

Los oocitos se procesaron individualmente en tubos eppendorf de 1,5 ml. Se digirieron con 200 µl de solución de lisis/extracción (SDS al 10% (p/v) en Tris 10 mM, pH 7.4) que contenía ROX 100 nM, que se utilizó como estándar interno de fluorescencia. Tras sonicarse durante 2 min a máxima potencia, se añadieron 50 µl de isopropanol al lisado celular para disolver los lípidos. Se centrifugaron a 20,000xg durante 10 min a 15°C y se recogieron 200 µl del sobrenadante claro. Se midió la fluorescencia del

Hoechst-33342 a unas longitudes de onda de excitación de 355 nm y de emisión de 460 nm. Para medir el ROX se utilizó 578 nm, como longitud de onda de excitación, y 604 nm para la emisión.

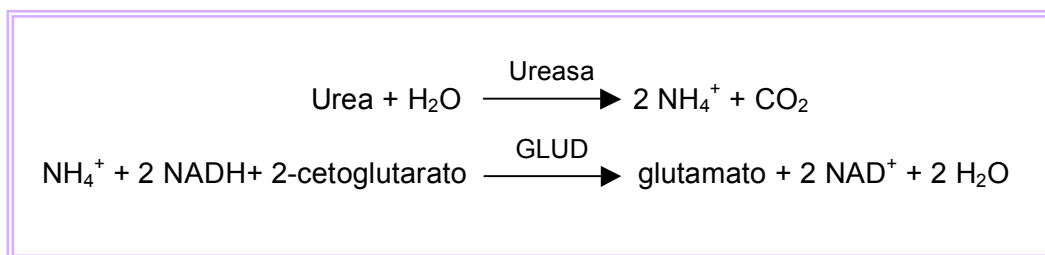
3.12.6. Determinación de radiactividad

La radiactividad de los isótopos ^3H y ^{14}C se midió en un contador de centelleo líquido, utilizando en cada medida 4 ml de líquido de centelleo.

3.12.7. Determinación de urea en suero

La determinación de urea en muestras de sangre se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Gutman y Bergmeyer (Gutman y Bergmeyer, 1974).

Este método se basa en la hidrólisis de la urea por la ureasa produciendo NH_4^+ y CO_2 . A continuación, el NH_4^+ por la acción de la glutamato deshidrogenada (GLUD) se convierte en glutamato en presencia de NADH y α -cetoglutarato. El consumo del cofactor NADH se mide en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 340 nm.



La disminución de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a NAD^+ es proporcional a la concentración de urea presente en la muestra.

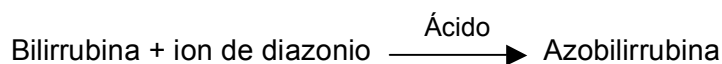
3.12.8. Determinación de pigmentos biliares por espectrofotometría

Para determinar la concentración de BV en bilis se utilizó el método descrito por McDonagh et al. (McDonagh et al., 1981). Las muestras se diluyeron 10 veces con solución tampón Tris 100 mM pH 7,4. La cantidad de BV en las muestras se calculó a partir de la recta patrón obtenida al representar la absorbancia a 680 nm frente de a la concentración.

La concentración de BR en bilis se determinó utilizando una modificación del método diazótico propuesto por Ehrlich en 1883. Este método se basa en la reacción de la bilirrubina directa presente en la muestra con el ácido sulfanílico diazoado formando

un complejo coloreado (azobilirrubina) que puede ser determinado espectrofotométricamente. Para acelerar esta reacción se han propuesto varias modificaciones. Así el método Malloy-Evelyn (Malloy y Evelyn, 1937), emplea metanol para catalizar la reacción azo-acopladora de la bilirrubina y mantener la azobilirrubina en solución.

En nuestro caso, el acoplamiento entre la bilirrubina y el ión de diazonio se realizó en un medio fuertemente ácido que a su vez mantiene la azobilirrubina en solución.



La intensidad del color del pigmento azoico formado es proporcional a la concentración de bilirrubina total y se midió espectrofotométricamente a 578 nm.

3.12.9. Determinación de pigmentos biliares por HPLC

Para determinar la cantidad de pigmentos biliares en muestras de suero y en oocitos se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que permite separar e identificar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre los analitos, la columna cromatográfica y la fase móvil. Un detector acoplado a la salida de la columna cromatográfica permite monitorizar el espectro de absorbancia, a una determinada longitud de onda, de un analito a lo largo del tiempo. El tiempo de retención es característico para cada compuesto

Para determinar la concentración de BV y BR en muestras de suero se utilizó una modificación del método de Blanckaert (Blanckaert, 1980; Briz et al., 2003a). Este método permite la extracción de los pigmentos biliares de muestras de suero y la transformación de los derivados glucuronados de BR en los correspondientes ésteres metílicos por metanólisis alcalina.

Para la determinación de la cantidad de BV y BR por HPLC, una vez extraídos y obtenidos los estéres metílicos de la BR, se evaporaron estos compuestos bajo atmósfera de N₂ y se disolvieron en 200 µl de solución de lisis/extracción que contenía 50 pmol de ROX en metanol (estándar interno).

A continuación, se llevó a cabo una elución en gradiente en una columna cromatográfica de fase reversa. Inicialmente la fase móvil estaba constituida por un 100% de tampón fosfato 2,5 mM, pH 7.2 (solución A). Transcurrido 1 min, se cambió a 50% de solución A y 50% de metanol, de manera lineal durante 2 min, proporción que se mantuvo durante 1 min antes de cambiar a 100% de metanol, de manera lineal

durante 5 min, hasta el final del análisis (20 min). El flujo de trabajo fue de 1 ml/min. El volumen de inyección fue de 100 µl. El registro de la absorbancia a 378 nm, 450 nm ó 567 nm se utilizó para detectar la BV, la BR o el ROX en las muestras, respectivamente.

Para medir la BV en los oocitos, éstos se transfirieron a viales de centelleo (2 oocitos/tubo). Seguidamente, se añadieron 150 µl de la solución de lisis/extracción y se sonicaron durante 5 min a 4°C. Los lisados se centrifugaron a 20000xg durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se utilizó para determinar la cantidad de BV por HPLC.

3.12.10. Determinación de ácidos biliares por LC-MS-MS

Para la cuantificación del contenido del TLC o del TSLC en los oocitos de *X. laevis* se utilizó la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS-MS). Esta técnica combina las propiedades de separación física del HPLC junto con la capacidad de análisis de la espectrometría de masas (MS) por lo que permite la detección e identificación específica de un compuesto químico dentro de una mezcla de compuestos o matriz.

La espectrometría de masas está basada en el análisis de iones que están en movimiento en condiciones de vacío. En un espectrómetro de masas hay que distinguir, en primer lugar, una fuente de ionización, donde se produce la ionización de la muestra y su conversión a fase gaseosa; posteriormente, un analizador de masas que controla el movimiento de los iones en estado gaseoso y actúa como filtro separando los iones en función de los valores de su relación masa/carga (m/z); y, por último, un detector que, según lo alcanzan los iones, genera las señales que se registran.

En el equipo utilizado en este estudio, el analizador de masas es un triple cuadrupolo. Un cuadrupolo está formado por cuatro rodillos paralelos sobre los que se aplican potenciales eléctricos de corriente continua y radiofrecuencias, que serían los componentes alternos. Los rodillos filtrarán todos los iones excepto aquellos con un valor de m/z específico, en función de los voltajes aplicados. Así, sólo los iones cuyo valor m/z sea el correspondiente al que los voltajes aplicados permitan pasar a través del cuadrupolo, alcanzarán el detector.

El funcionamiento del equipo está basado en la espectrometría de masas en tándem, en concreto, la del triple cuadrupolo, formado por tres cuadrupolos conectados en serie. El primer cuadrupolo sigue un mecanismo de actuación idéntico al explicado anteriormente y permite seleccionar iones por filtrado. El segundo cuadrupolo es una celda de colisión en la cual se requiere la presencia de un gas de colisión inerte, como el nitrógeno, y en la que se aplica un voltaje para conseguir la fragmentación de los iones que llegan a ella. Los fragmentos iónicos resultantes pasan al tercer cuadrupolo,

donde se lleva a cabo una segunda etapa de filtrado, a partir de la cual se puede aislar y examinar un único ión producto, generado en la celda de colisión a partir de un determinado ión precursor al que se permitió específicamente el paso en el primer cuadrupolo. Este modo de trabajo, denominado MRM (Multiple Ion Monitoring), garantiza una elevada especificidad en el análisis.

Preparación de las muestras

Para detectar el contenido de TSLC, los oocitos se procesaron individualmente en tubos eppendorf de 1,5 ml. Se añadieron 100 µl de solución de lisis/extracción (metanol:agua, 9:1) conteniendo TC 0,5 µM, que se utilizó como estándar interno. Para su lisis, se sonicaron durante 1 min a máxima potencia y a 4°C. A continuación, se centrifugaron a 20,000xg durante 5 min a 4°C y se recogieron 70 µl del sobrenadante para el análisis del contenido de ácidos biliares por LC-MS-MS.

Para determinar la cantidad de TLC y del TSLC sintetizado por los oocitos a partir del TLC cargado, los oocitos se procesaron conjuntamente en un tubo de 10 ml (12 oocitos/tubo). Se añadieron 200 µl de solución lisis/extracción (metanol:medio de captación con sodio, 0,95:1,05), conteniendo TC 0,5 µM como estándar interno. Tras su sonicación y centrifugación, se recogieron 150 µl del sobrenadante para su análisis por LC-MS-MS.

Análisis de ácidos biliares por LC-MS-MS

Para el análisis de los ácidos biliares por LC-MS-MS se llevó a cabo utilizando una modificación del método descrito por Ye y colaboradores (Ye et al., 2007).

Para la separación cromatográfica se empleó una columna de fase reversa termostatzada a 35°C. Para la separación del TSLC se utilizó un método isocrático usando como fase móvil una mezcla de metanol:agua (60:40), conteniendo ambos constituyentes 5 mM de acetato amónico y 0,01% ácido fórmico, pH 4,6. El tiempo del análisis fue de 3 min. Utilizando este método cromatográfico el tiempo de retención del TSLC fue de 0,97 min.

En el caso del TLC/TSLC, utilizando la misma columna, se realizó una elución en gradiente comenzando con una mezcla metanol:agua (60:40) que se mantuvo durante 2 min. A continuación se cambió a una proporción metanol:agua (95:5) de manera lineal durante 1 min y se mantuvo durante otro min, antes de volver de nuevo a la condición basal (60:40). Esta mezcla se mantuvo hasta el final del análisis (7,5 min). Con este método, el TSLC salió en el mismo tiempo de retención que en isocrático (0,97 min) y el TLC salió a los 4,39 min.

El flujo de trabajo fue de 0,3 ml/min y el volumen de inyección fue de 2 µl, en todos los casos.

La determinación de los ácidos biliares en el triple cuadrupolo se llevó a cabo en ionización negativa, para obtener los aniones moleculares de cada una de las especies moleculares analizada. Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas (N_2) $350^{\circ}C$, flujo del gas 10 ml/min, presión del nebulizador 20 psi, voltaje 2500 V. Se empleó el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica de cada uno de los iones precursores (ión molecular - H^+) a los respectivos iones producto resultantes. En el caso del TSLC se siguió la transición específica de 280,7 m/z a 464 m/z y para el TLC se siguió la transición del ion precursor 482,4 m/z al ion producto 80,2 m/z .

Se construyeron rectas patrón para cada uno de los ácidos biliares mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de 0,05 a 5 μM .

Se corrigió la concentración de cada ácido biliar calculada a partir de su recta patrón por la recuperación obtenida para el estándar interno TC ($84 \pm 2\%$), que se detectó siguiendo la transición específica de 514,3 m/z a 80,2 m/z . El tiempo de retención del TC fue de 1,34 min en ambos métodos cromatográficos.

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM). Para calcular la significación estadística de la comparación entre dos medias se utilizó el test de la t de Student. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni o el test de t de Student de valores apareados, según el caso. Las correlaciones se obtuvieron por el método de los mínimos cuadrados.

El análisis estadístico se realizó en un ordenador Macintosh G4 (Appel Computer, Inc., Cupertino, CA).

4.1. IDENTIFICACIÓN DE TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS COLEFÍLICOS EN LA PLACENTA HUMANA

La placenta juega un papel crucial en la transferencia materno-fetal de una gran variedad de sustancias como oxígeno, nutrientes, vitaminas, hormonas y sustancias de desecho. El feto es capaz de sintetizar diversos compuestos colefílicos, que pueden llegar a ser tóxicos si se acumulan en el compartimento fetal. Puesto que la capacidad excretora del hígado y riñón fetales es muy escasa dada la inmadurez de estos órganos durante la vida intrauterina, esta función excretora es llevada a cabo por la placenta y el hígado materno, con una menor contribución del riñón materno (Marin et al., 2003).

Desde hace varios años nuestro grupo de investigación ha tratado de caracterizar los sistemas de transporte que están implicados en la transferencia placentaria de ácidos biliares (Marin et al., 1995; Marin et al., 1990) y bilirrubina (Serrano et al., 2002) y que juegan un papel más importante que la difusión simple, confirmando al proceso de transferencia placentaria características de vectorialidad feto-materna (Briz et al., 2003a; Macias et al., 2000). En la última década se han hecho avances en la identificación de varias isoformas de proteínas transportadoras de las familias OATP (Briz et al., 2003b; Sato et al., 2003; St-Pierre et al., 2002) y ABC (St-Pierre et al., 2000) en la placenta que podrían estar implicadas en la función excretora de este órgano.

Los cultivos primarios de trofocitos humanos presentan algunos inconvenientes para el estudio de las bases moleculares y de modulación de la expresión de transportadores de la barrera placentaria. Además de la complejidad de obtener y purificar estas células, su uso presenta la grave dificultad de un rápido cambio fenotípico al ponerlas en cultivo.

Las células derivadas de coriocarcinoma humano, BeWo, JAr y Jeg-3, son un modelo *in vitro* utilizado desde hace más de tres décadas para estudiar aspectos celulares, moleculares y endocrinos del trofoblasto humano (Wolfe, 2006). Desde un punto de vista morfológico, son muy similares a sus células de origen, el trofoblasto en el primer trimestre de la gestación. Además de ser fáciles de cultivar y de crecer formando monocapas confluentes en un periodo de tiempo relativamente corto, secretan gonadotropina coriónica humana, lactógeno placentario y estrógenos, características propias del trofoblasto humano.

Por todo ello, estas células podrían ser una alternativa a los cultivos primarios de trofocitos, siempre que expresasen de forma estable y a un nivel comparable al de los trofocitos recién aislados, tanto los sistemas de transporte de aniones orgánicos colefílicos como los receptores nucleares implicados en su regulación.

Para evaluar la capacidad de protección de la placenta al feto y para elucidar la potencial utilidad farmacológica o el riesgo toxicológico de ciertos fármacos y

xenobióticos, es necesario conocer los transportadores involucrados en la función excretora de la placenta y los mecanismos de regulación de estas proteínas. Por esta razón nos planteamos como primer objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral:

1. Caracterizar las proteínas transportadoras responsables de la función excretora “de tipo hepatobiliar” en la placenta humana.
2. Investigar la utilidad de las líneas derivadas de coriocarcinoma humano, BeWo, JAr y Jeg-3, como posibles modelos *in vitro* para estudios de regulación de la expresión y de la función de los transportadores de membrana involucrados en la función excretora y de protección de la placenta.

4.1.1. Cuantificación de los niveles de expresión de transportadores de aniones orgánicos colefilicos en cultivos primarios de trofocitos humanos y líneas celulares de coriocarcinoma humano

Los niveles de expresión génica y sus cambios en diversas circunstancias en distintos tejidos se han estudiado tradicionalmente por Northern blot, PCR competitiva, hibridación *in situ* o ensayos de protección de ARNasas. Aunque estas técnicas han demostrado ser fiables, requieren grandes cantidades de ARN, el procesamiento de las muestras es largo y en ocasiones son difíciles de optimizar y/o cuantificar. Además, generalmente no es posible analizar varios genes en una misma muestra, ni en muchas muestras a la vez. La RT-PCR cuantitativa a tiempo real permite superar muchos de estos inconvenientes, por lo que elegimos esta técnica para identificar y cuantificar los niveles de expresión de genes implicados en el transporte de aniones orgánicos en trofocitos aislados de placentas humanas a término y compararlos con los de las líneas celulares BeWo, JAr y Jeg-3.

En la tabla 1 del apartado 3.6.3. de Material y Métodos se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores y las sondas TaqMan[®] utilizadas en las reacciones de PCR. También se muestra el tamaño de los amplicones esperados y los números de acceso de las secuencias diana publicados en la base de datos GenBank.

En primer lugar, se confirmó que todas las parejas de cebadores amplificaban un único producto y no había señal en los blancos, es decir, en las reacciones en las que no se añadía ADNc.

Como ejemplo, se muestra en la figura 1 la curva de disociación obtenida al final de la PCR cuando se usaron los cebadores diseñados para amplificar un fragmento de la secuencia del gen que codifica para la proteína MRP4. En este caso, se utilizó como molde de la reacción de PCR el ADNc obtenido por RT a partir del ARN total extraído de la línea celular Caco-2, derivada de adenocarcinoma de colon humano, ya que en

estudios previos realizados en nuestro laboratorio se había detectado su expresión (datos no mostrados).

Como se observa, el producto de la PCR presenta un único pico resultado de la desnaturalización del fragmento de ADN amplificado, mientras que en el blanco de reacción no aparece ningún pico en todo el intervalo de temperaturas. Para confirmar que la presencia de un único pico se correspondía con un único fragmento amplificado, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2,5% (figura 1, inserto). Sólo se encontró una banda del tamaño esperado en la muestra problema y no se visualizaron bandas en la calle correspondiente al blanco de reacción. Estos resultados indicaban que las condiciones utilizadas eran las adecuadas para detectar y cuantificar la expresión de este gen.

De manera análoga se comprobó la especificidad de todos los oligonucleótidos utilizados para amplificar el resto de secuencias estudiadas (datos no mostrados).

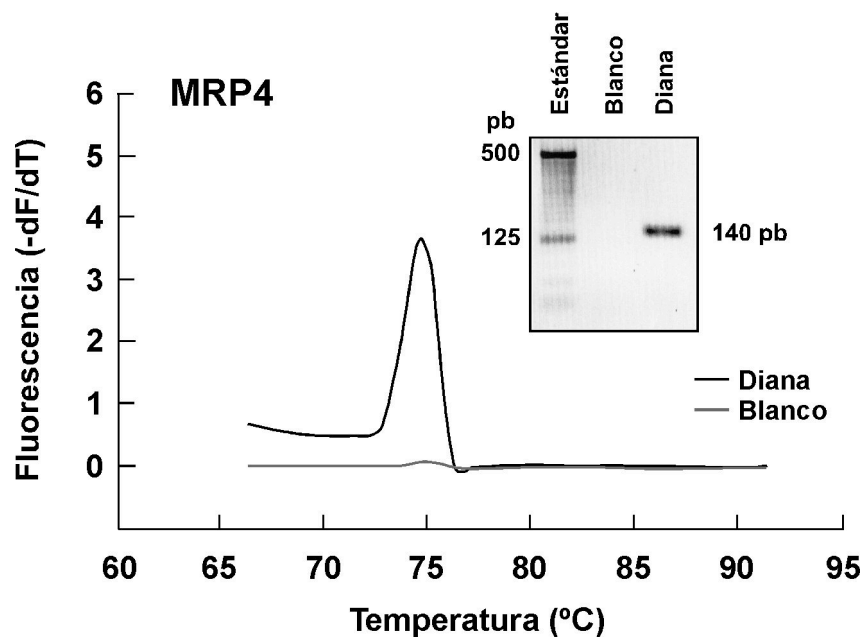


Figura 1. Curva de disociación del producto amplificado por PCR cuantitativa a tiempo real a partir del ADNc de la línea celular derivada de adenocarcinoma de colon humano Caco-2, utilizando cebadores específicos diseñados para amplificar MRP4. El inserto muestra el producto obtenido en la PCR tras la electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. Calle 1: estándar de ADN, calle 2: control negativo (Blanco), calle 3: producto de PCR utilizando como molde el ADNc de Caco-2.

El siguiente paso para poder cuantificar de forma absoluta la expresión de estos transportadores fue la determinación de rectas patrón utilizando diluciones seriadas a partir de una cantidad conocida de un fragmento de ADNc de cada gen obtenido por

PCR, tal y como se explica en el apartado 3.6.5. de Material y Métodos. En la figura 2 se muestran las curvas de amplificación obtenidas para MRP4 cuando se utilizaron 20, 200, 2.000, 20.000, 200.000 y 2.000.000 de copias del fragmento de MRP4 amplificado.

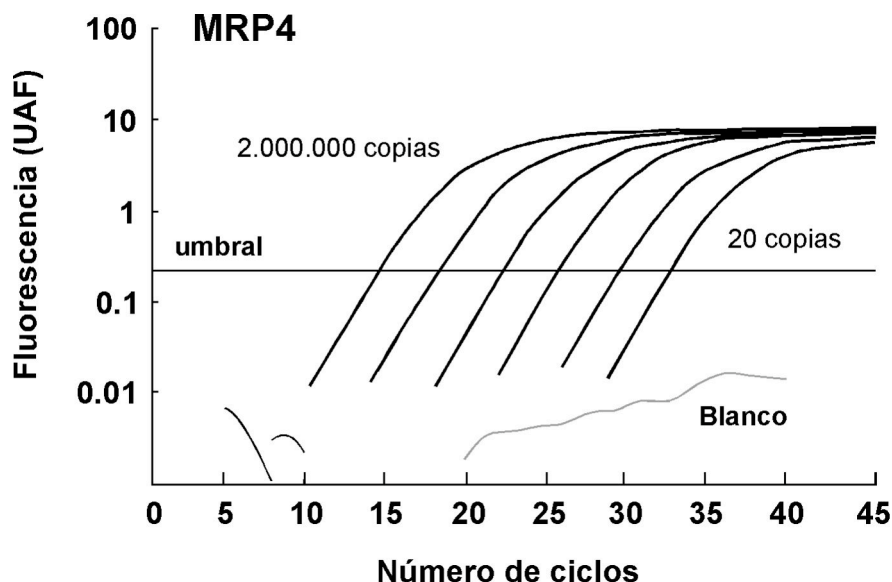


Figura 2. Curva de evolución de la fluorescencia durante la amplificación de un fragmento de MRP4 en muestras que contenían de partida entre 20 y 2.000.000 de copias.

Estas curvas de evolución de la fluorescencia se realizaron para todos los transportadores de aniones orgánicos colefilicos objeto de estudio y para el ARNr 18S que se escogió como normalizador. En la tabla 1 se recogen las rectas patrón obtenidas, junto con los coeficientes de correlación (R^2) y la eficacia calculada para cada reacción.

En todos los casos los valores para R^2 fueron próximos a 1,0. La eficacia más baja calculada, 70,6%, se obtuvo para la pareja de cebadores que amplifican una región del gen *SLCO2B1* que codifica para el transportador OATP2B1. Para el resto de parejas de oligonucleótidos se consiguió una eficacia superior al 80%. Sólo para MRP1, la eficacia teórica obtenida fue superior al 100%, concretamente 103%.

Como ya se ha mencionado, para corregir las pequeñas variaciones que pueden producirse en el proceso de extracción del ARN total y en la RT de cada muestra, es necesario normalizar los niveles de expresión de los ARNm estudiados respecto a un gen de referencia o normalizador. Los normalizadores más utilizados son la β -actina, la ciclofilina, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el ARNr 18S.

Ningún ARNm es absolutamente estable en protocolos experimentales que incluyen manipulaciones quirúrgicas o tratamientos (Bond et al., 2002), pero las diferencias deben ser pequeñas para un mismo gen en distintos tejidos para que pueda ser considerado un gen de referencia (Medhurst et al., 2000). En nuestro caso, escogimos el ARNr 18S como normalizador, ya que hemos comprobado que cuando se obtiene ARN total de distintos tejidos (hígado o placenta humanos) o de células en cultivo, la abundancia de este ARNr es similar en todas las muestras estudiadas encontrándose valores de Ct de 12,22 para trofocitos aislados, de 12,46 para células BeWo, de 12,80 para células JAr y de 12,15 para células Jeg-3.

Tabla 1. Rectas patrón obtenidas para cada pareja de cebadores ensayados.

Proteína/Gen	Recta Patrón	R ²	Eficacia
OATP1A2 (<i>SLCO1A2</i>)	$y = 37,82 - 3,52 \times \log_{10}(N)$	0,9930	92,3%
OATP1B1 (<i>SLCO1B1</i>)	$y = 20,35 - 3,57 \times \log_{10}(N)$	0,9994	90,6%
OATP1B3 (<i>SLCO1B3</i>)	$y = 36,25 - 3,34 \times \log_{10}(N)$	0,9938	99,2%
OATP2B1 (<i>SLCO2B1</i>)	$y = 45,56 - 4,31 \times \log_{10}(N)$	0,9983	70,6%
OSTα (MGC39807)	$y = 35,12 - 3,45 \times \log_{10}(N)$	0,9997	94,9%
OSTβ (FLJ26090)	$y = 36,27 - 3,39 \times \log_{10}(N)$	0,9993	97,2%
MDR1 (<i>ABCB1</i>)	$y = 37,25 - 3,48 \times \log_{10}(N)$	0,9983	93,8%
MDR3 (<i>ABCB4</i>)	$y = 36,99 - 3,39 \times \log_{10}(N)$	0,9988	97,2%
BSEP (<i>ABCB11</i>)	$y = 42,41 - 3,79 \times \log_{10}(N)$	0,9960	83,6%
MRP1 (<i>ABCC1</i>)	$y = 29,90 - 3,25 \times \log_{10}(N)$	0,9948	103,1%
MRP2 (<i>ABCC2</i>)	$y = 39,84 - 3,89 \times \log_{10}(N)$	0,9995	80,7%
MRP3 (<i>ABCC3</i>)	$y = 42,67 - 3,55 \times \log_{10}(N)$	0,9990	91,3%
MRP4 (<i>ABCC4</i>)	$y = 38,19 - 3,76 \times \log_{10}(N)$	0,9997	84,4%
MRP8 (<i>ABCC11</i>)	$y = 39,34 - 3,72 \times \log_{10}(N)$	0,9992	85,7%
BCRP (<i>ABCG2</i>)	$y = 41,57 - 3,91 \times \log_{10}(N)$	0,9998	80,2%
FIC1 (<i>ATP8B1</i>)	$y = 37,37 - 3,38 \times \log_{10}(N)$	0,9997	97,6%
ARNr 18S	$y = 42,32 - 3,79 \times \log_{10}(N)$	0,9952	83,4%

R², Coeficiente de correlación. N, número de copias de cada fragmento.

Eficacia = $(10^{(-1/P)} - 1) \times 100$, donde P es la pendiente de la recta.

Una vez escogido el normalizador y puestas a punto las condiciones óptimas para la realización de la RT-PCR cuantitativa, se utilizó esta técnica para cuantificar de forma absoluta la abundancia del ARNm de los diferentes transportadores de aniones

orgánicos colefílicos en el tejido trofoblástico humano y en las tres líneas celulares derivadas de coriocarcinoma humano.

En primer lugar, se determinó la abundancia absoluta del ARNm de varios miembros de la familia OATP y del heterodímero OST α /OST β . Los resultados obtenidos, expresados como número de copias del gen de interés por cada 10⁶ copias del ARNr 18S en cada muestra, están recogidos en la tabla 2. Como valor de referencia, se determinaron los niveles de expresión de estas proteínas en el hígado humano adulto.

Como puede observarse, OATP1B1 es la isoforma más expresada en el hígado adulto seguida de OATP1B3, OATP2B1 y, muy alejada en sus niveles de expresión, se encuentra OATP1A2. Este perfil de expresión coincide con el descrito en nuestro grupo (Briz et al., 2006) y por otros autores (Hagenbuch y Meier, 2004), y refleja la relevancia de cada isoforma en la captación hepática de aniones orgánicos colefílicos. Así, la isoforma más relevante en el transporte hepático de compuestos colefílicos es OATP1B1 (Kullak-Ublick et al., 2000; Meier y Stieger, 2002) mientras que OATP1A2, dada su baja expresión en hepatocitos adultos, tendría un papel minoritario en dicho transporte (Kullak-Ublick et al., 2001).

Si observamos el patrón de expresión de OATPs en los trofocitos aislados y en las líneas celulares derivadas de coriocarcinoma humano, encontramos que se detectó la expresión de OATP1A2, OATP1B3 y OATP2B1 en todos los casos, pero no se encontraron niveles detectables del ARNm de OATP1B1.

La ausencia de expresión de OATP1B1 en los trofocitos aislados concuerda con los resultados encontrados por nuestro grupo (Briz et al., 2003b) y por otros investigadores en estas células (Ugele et al., 2003), y sugieren que, a diferencia de lo que sucede en el hígado adulto, OATP1B1 no tiene un papel crucial en el transporte de estos compuestos a través del trofoblasto.

Los niveles de expresión de OATP1A2 hallados en trofocitos fueron más bajos que en el hígado. Sin embargo, en las líneas celulares se detectó una mayor expresión del transportador con respecto a la encontrada en el hígado y en particular, los niveles más altos se detectaron en las células JAr. Dado que estas líneas derivan del trofoblasto en el primer trimestre de la gestación, estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente donde se observó que la expresión placentaria de OATP1A2 se encontraba más elevada en el primer trimestre que en el último trimestre de la gestación (Patel et al., 2003). También coinciden con trabajos previos de nuestro grupo y de otros grupos donde no se detectaron o sólo se encontraron niveles muy bajos de expresión de su ARNm en la placenta humana a término (Briz et al., 2003b; Patel et al., 2003; Tamai et al., 2000; Ugele et al., 2003). Esto sugiere que, al igual que en hígado, no tenga cuantitativamente un papel relevante en el transporte de aniones orgánicos en la placenta a término.

Tabla 2. Cuantificación absoluta de la expresión del ARNm de proteínas transportadoras de aniones orgánicos colefílicos.

Proteína/Gen	Hígado	Trofocitos	BeWo	JAr	Jeg-3
OATP1A2 (<i>SLCO1A2</i>)	5,17 ± 0,1 ^a	0,41 ± 0,2	11,3 ± 4,4 ^a	54 ± 14,5 ^a	20 ± 3,1 ^a
OATP1B1 (<i>SLCO1B1</i>)	4894 ± 1208	ND	ND	ND	ND
OATP1B3 (<i>SLCO1B3</i>)	923 ± 148 ^a	31 ± 3,1	66 ± 15 ^a	618 ± 102 ^a	10 ± 4,5 ^a
OATP2B1 (<i>SLCO2B1</i>)	256,5 ± 10,4	224,4 ± 60	21,1 ± 1,1 ^a	34,4 ± 4,9 ^a	16,3 ± 4,6 ^a
OSTα (<i>MGC39807</i>)	24,2 ± 2,6 ^a	0,58 ± 0,1	0,55 ± 0,1	0,35 ± 0,1	1,26 ± 0,2
OSTβ (<i>FLJ26090</i>)	0,1 ± 0,01	ND	ND	ND	ND

Los valores, normalizados por el contenido de ARNr 18S, están expresados como número de copias del gen de interés por cada 10⁶ copias del ARNr 18S determinadas en cada muestra. La RT-PCR cuantitativa se realizó por triplicado a partir de muestras obtenidas de cuatro cultivos diferentes. Los valores son medias ± EEM. ND, no detectable. ^a, p < 0,05 al comparar los niveles de expresión respecto a trofocitos por el test de Bonferroni para valores múltiples.

Para OATP2B1 se detectó el patrón opuesto; su expresión fue más baja en las líneas celulares que en los trofocitos aislados, que presentaron niveles de expresión comparables a los encontrados en el hígado. Además, este transportador resultó ser la isoforma más abundante en trofocitos de las cuatro OATPs estudiadas. Estos resultados concuerdan con los presentados por otros autores (St-Pierre et al., 2002; Ugele et al., 2003).

Existe cierta controversia sobre la capacidad de OATP2B1 para transportar determinados compuestos colefílicos, como los ácidos biliares. Así, mientras que su ortólogo de rata *Oatp2b1* es capaz de transportar ácido taurocólico entre otros sustratos (Nishio et al., 2000), no se encontró esta habilidad para OATP2B1 cuando se expresó en oocitos de rana *Xenopus laevis* (St-Pierre et al., 2002). Por ello se ha sugerido que su papel en la placenta estaría relacionado con el transporte de esteroides sulfatados (Ugele et al., 2008; Ugele et al., 2003).

Otro posible candidato, para llevar a cabo la captación de aniones orgánicos colefílicos por el trofoblasto, es el OATP1B3. Como se observa en la tabla 2, los niveles

encontrados de su ARNm fueron más bajos en trofocitos y en las líneas celulares (excepto en las células JAr) que en el hígado. Estos resultados coinciden con los presentados por nuestro grupo (Briz et al., 2003b) y por otros grupos (Ugele et al., 2003), donde por PCR no detectaron la expresión del transportador en la placenta total y sólo encontraron niveles muy bajos de su ARNm en trofocitos.

Por último, se analizó la expresión del heterodímero OST α /OST β que ha sido recientemente descrito como un transportador sodio independiente basolateral de ácidos biliares y esteroides en el intestino, riñones y epitelio biliar (Ballatori et al., 2005). Se detectaron niveles muy bajos de expresión de OST α en los trofocitos aislados y en las líneas celulares. Por otra parte, no se detectó la expresión del ARNm de OST β ni en trofocitos ni en las líneas. Este dato, junto con el hecho de que es necesario que se forme el heterodímero para que se produzca el transporte (Dawson et al., 2005), sugiere que este complejo proteico no parece participar en la difusión facilitada de moléculas esteroideas a través del trofoblasto humano al menos de forma similar a como funciona en otros epitelios.

Durante los últimos años se ha puesto de manifiesto la presencia de varias proteínas de la familia ABC en la placenta (St-Pierre et al., 2000), y se ha propuesto que estos transportadores podrían ser los encargados de retirar compuestos potencialmente tóxicos, como metabolitos endógenos o xenobióticos, del compartimento fetal (St-Pierre et al., 2000). En este trabajo, decidimos ampliar estos estudios por lo que se determinó en trofocitos y en las líneas celulares BeWo, JAr y Jeg-3 la abundancia absoluta del ARNm de varios miembros de la familia de transportadores ABC y de la ATPasa de tipo II FIC1. Los resultados obtenidos están representados en la tabla 3. El hígado humano adulto se utilizó como valor de referencia de la expresión de estas bombas exportadoras.

Dentro de la subfamilia ABCB, los niveles de expresión encontrados para MDR1 fueron similares en hígado, trofocitos y en las líneas celulares BeWo y JAr, mientras que en Jeg-3 sus valores fueron 2 veces más bajos. Estudios previos han demostrado la presencia de MDR1 en el sincitiotrofoblasto de placentas humanas a partir de la sexta semana de gestación (Bremer et al., 1992; Sun et al., 2006). Su expresión en la placenta se ha relacionado con un posible papel protector durante el desarrollo fetal (Nakamura et al., 1997; Smit et al., 1999). Nuestros resultados confirman la presencia de MDR1 en trofocitos aislados de placentas humanas a término y se correlacionan con los publicados por otros grupos donde se detectó una fuerte expresión de su ARNm en este órgano, con niveles comparables a los que encontraban en hígado e intestino (Bremer et al., 1992). Sin embargo, existe cierta controversia sobre los niveles de expresión de esta bomba en células derivadas de coriocarcinoma humano, (Atkinson et al., 2003; Evseenko et al., 2006; Utoguchi et al., 2000).

Tabla 3. Cuantificación absoluta de la expresión del ARNm de bombas ABC, exportadoras de aniones orgánicos colefilicos, y de la ATPasa de tipo II FIC1.

Proteína/Gen	Hígado	Trofocitos	BeWo	JAr	Jeg-3
MDR1 (ABCB1)	15,1 ± 2,3	15,5 ± 1,3	19,3 ± 3,9	19,1 ± 4,9	7,9 ± 0,9 ^a
MDR3 (ABCB4)	73,7 ± 5,3 ^a	0,3 ± 0,01	0,53 ± 0,1	0,42 ± 0,1	0,4 ± 0,04
BSEP (ABCB11)	983 ± 27,7 ^a	2,9 ± 0,2	ND	6,4 ± 1,2 ^a	0,7 ± 0,2
MRP1 (ABCC1)	3,95 ± 1,2 ^a	45,4 ± 11,2	60,9 ± 4,8	45 ± 25,8	66,9 ± 7,6
MRP2 (ABCC2)	181 ± 17,8	2,68 ± 0,1	11,5 ± 1,0 ^a	27,9 ± 0,5 ^a	6,54 ± 0,6 ^a
MRP3 (ABCC3)	240 ± 0,8 ^a	419 ± 56,1	2,51 ± 0,9 ^a	2,21 ± 0,4 ^a	2,16 ± 0,8 ^a
MRP4 (ABCC4)	1,76 ± 0,1 ^a	14 ± 0,5	5,25 ± 0,4 ^a	3,61 ± 0,1 ^a	3,17 ± 0,2 ^a
MRP8 (ABCC11)	6,01 ± 0,8 ^a	2,34 ± 0,1	10,4 ± 0,8 ^a	11,5 ± 1,2 ^a	29,6 ± 1,7 ^a
BCRP (ABCG2)	10,4 ± 1,0 ^a	81,6 ± 7,1	438 ± 42 ^a	358 ± 14,7 ^a	138 ± 7,0 ^a
FIC1 (ATP8B1)	38,9 ± 0,6 ^a	209 ± 6,2	312 ± 15,4 ^a	1293 ± 105 ^a	159 ± 20,1 ^a

Los valores, normalizados por el contenido de ARNr 18S, están expresados como número de copias del gen de interés por cada 10⁶ copias del ARNr 18S determinadas en cada muestra. La RT-PCR cuantitativa se realizó por triplicado a partir de muestras obtenidas de cuatro cultivos diferentes. Los valores son medias ± EEM. ND, no detectable. ^a, p<0,05 al comparar los niveles de expresión respecto a trofocitos por el test de Bonferroni para valores múltiples.

En cuanto a la expresión de otros miembros de la subfamilia ABCB, encontramos que a diferencia del hígado, los niveles de ARNm de MDR3 y de BSEP fueron apenas detectables tanto en trofocitos aislados como en las tres líneas celulares, e incluso en células BeWo no llegó a detectarse el ARNm de BSEP.

A diferencia de nuestros resultados, otros grupos han detectado la expresión de MDR3, a nivel de su ARNm y de la proteína, en placentas a término, trofocitos y células de coriocarcinoma (Evseenko et al., 2006; Patel et al., 2003). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el trofoblasto humano no posee niveles elevados del ARNm de MDR3.

La presencia de BSEP en la placenta de rata y humana ya se había descrito con anterioridad. Estudios recientes han detectado niveles bajos de expresión de su ARNm en la placenta durante el primer trimestre del embarazo y cantidades indetectables en el último trimestre (Patel et al., 2003). Nuestros resultados coinciden con estos datos, ya que encontramos niveles muy bajos de expresión del transportador en los trofocitos aislados y sólo ligeramente más altos en las células JAr que, como ya se ha mencionado, derivan del trofoblasto en el primer trimestre de la gestación. Estos datos sugieren que posiblemente tenga un papel minoritario en el transporte de aniones orgánicos colefilicos en la placenta.

En cuanto a las proteínas de la subfamilia ABCC, se encontró que la abundancia de los transcritos de MRP1 fue más alta en trofocitos aislados y en las tres líneas celulares que en el hígado adulto. Por el contrario, los niveles más elevados de MRP2 se hallaron en el hígado. La expresión de MRP3 fue alrededor de 200 veces más alta en trofocitos que en las líneas celulares, donde su transcripción fue muy baja. En cuanto a la abundancia del ARNm de MRP4 y de MRP8, encontramos que estaban menos expresados en el hígado que en el resto de células, detectándose los valores más altos de MRP4 en los trofocitos aislados mientras que para MRP8, la expresión más elevada se encontró en las células JAr.

Algunos miembros de esta subfamilia se han relacionado con el fenotipo de resistencia a la quimioterapia en las células tumorales. Aunque existe cierto solapamiento entre los sustratos de MDR1 y algunas MRPs, se ha visto que estos últimos exportan preferentemente compuestos conjugados con glutatión, ácido glucurónico o sulfato (Homolya et al., 2003). Nuestros resultados, y los obtenidos por otros grupos en los últimos años (Evseenko et al., 2006; Pascolo et al., 2003; St-Pierre et al., 2000), demuestran la presencia de transcritos de varias isoformas de MRPs en el trofoblasto humano. Respecto al hígado humano, destaca la mayor transcripción de MRP1, MRP3 y MRP4 encontrada en los trofocitos aislados. Estos resultados nos indican que posiblemente estas bombas estén implicadas en la excreción de fármacos y/o aniones orgánicos conjugados para reducir su acumulación en el compartimento fetal.

Finalmente, encontramos que el ARNm de BCRP fue 8 veces más abundante en trofocitos que en el hígado adulto. Además, esta proteína se encontraba sobreexpresada en las células BeWo y JAr respecto a los trofocitos aislados (aproximadamente 5 veces).

Estos resultados coinciden con su patrón de distribución tisular ya que la placenta es el órgano donde presenta su máxima expresión (Allikmets et al., 1998). La sobreexpresión de BCRP en las líneas celulares respecto a los trofocitos aislados coincide con resultados recientemente publicados, obtenidos por PCR cuantitativa y Western blot (Evseenko et al., 2006). Su elevada expresión sugiere que este transportador podría ejercer un importante papel en el eflujo de aniones orgánicos colefilicos de la placenta.

Por último, encontramos que FIC1 estaba más expresado en trofocitos y en las líneas celulares (en particular en JAr) que en el hígado adulto.

Existe cierta controversia en relación a sus niveles de expresión detectados por RT-PCR en placentas a término. En un estudio realizado hace algunos años no se detectó FIC1 en la placenta a término (Mouro et al., 1999), probablemente debido a que el ARNm del trofoblasto se encontraba muy diluido en el total de tejidos de la placenta. Más recientemente, se ha descrito una baja expresión de esta proteína que, además, va disminuyendo a lo largo de la gestación (Patel et al., 2003). En este estudio los transcritos de FIC1 se detectaron tanto en trofocitos como en las líneas celulares. El papel fisiológico de FIC1 en los procesos de barrera y transporte de la placenta no se conocen aún con claridad pero tal vez, y de una manera similar a su función en el tejido hepático, se trate de un mecanismo regulador que mantiene la asimetría de la membrana.

4.1.2. Inmunolocalización de transportadores de aniones orgánicos colefílicos en cortes de placenta humana a término

Para ampliar el estudio sobre la identificación de los transportadores de aniones orgánicos colefílicos implicados en la función de tipo hepatobiliar de la placenta, decidimos investigar su expresión por inmunohistoquímica en cortes de placentas humanas a término.

Los anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones están recogidos en la tabla 7, en el apartado 3.11 de Material y Métodos.

El primer paso para llevar a cabo esta parte del estudio, fue localizar los principales tipos celulares que se encuentran en las vellosidades coriónicas de la placenta humana, por lo que fue necesario elegir unos marcadores adecuados para identificar estas células.

Tras las primeras evidencias de la utilización de citoqueratinas como marcadores de trofocitos (Daya y Sabet, 1991), diversos autores han descrito el uso de la citoqueratina 7 (CK7) como marcador altamente específico de estas células (Briz et al., 2003b; Maldonado-Estrada et al., 2004; Muhlhauser et al., 1995). Por ello decidimos escoger esta proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto para localizar células trofoblásticas vellositarias.

La figura 3 muestra el marcaje intracelular característico de la CK7 en cortes de placenta humana a término. Para facilitar la interpretación de las imágenes los núcleos se tiñeron con Dapi. Como cabía esperar los trofocitos vellositarios se encontraban formando el epitelio que rodea las vellosidades coriónicas y no se observó marcaje en el estroma.

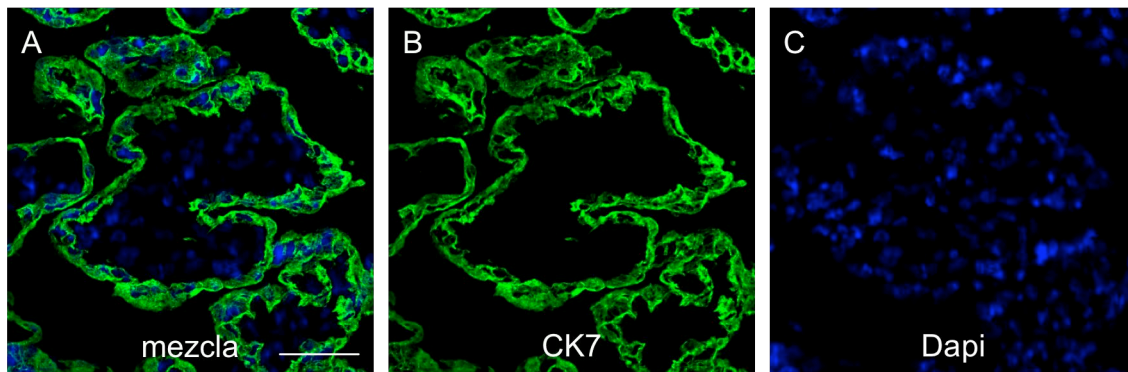


Figura 3. Localización por inmunofluorescencia en cortes de placenta humana a término de la citoqueratina 7 (CK7) (B), en verde, como marcador de trofocitos. A, muestra la superposición del marcaje de CK7 con los núcleos teñidos con Dapi (C). Barra de escala: 50 μ m.

Para localizar las células endoteliales vasculares se utilizó un anticuerpo frente a la VE-caderina (VE-Cad, “vascular endothelial-cadherin”) (Lampugnani et al., 1992). Se trata de una proteína de adhesión intercelular que se localiza en las uniones adherentes de las células endoteliales manteniendo su contacto (Breier et al., 1996). Estudios previos han demostrado la utilización de VE-Cad para localizar estas células en placentas humanas a término (Dye et al., 2001; Leach et al., 1993).

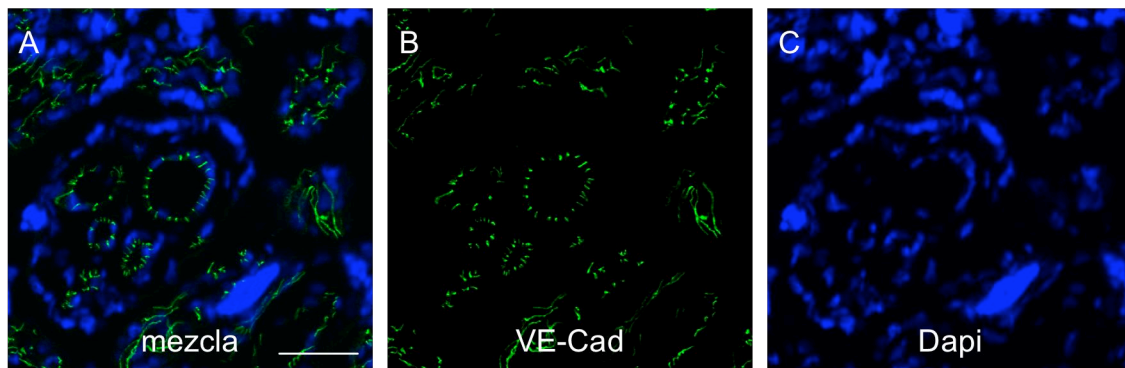


Figura 4. Localización por inmunofluorescencia en cortes de placenta humana a término de la proteína de adhesión intercelular VE-caderina (VE-Cad) (B), en verde, como marcador de células endoteliales vasculares. A, muestra la superposición del marcaje de VE-Cad con los núcleos teñidos con Dapi (C). Barra de escala: 50 μ m

En la figura 4 se puede observar la localización de la VE-Cad en cortes de placenta humana a término. La VE-Cad se aprecia como discretas líneas que corresponden a

las zonas de unión entre las células endoteliales de los vasos que se encuentran en el estroma de las vellosidades coriónicas.

Entre los diversos marcadores existentes para localizar macrófagos escogimos un anticuerpo frente a la glicoproteína CD163 por ser el más apropiado para identificar de forma específica las células de Hofbauer o macrófagos residentes en la placenta (Blaschitz et al., 2000). Esta glicoproteína está presente en la superficie y en el citoplasma de la mayoría de los macrófagos tisulares (Backe et al., 1991).

En la figura 5 se muestra la tinción específica de las células de Hofbauer en un corte transversal de una vellosidad coriónica donde se puede intuir el sincitiotrofoblasto, siguiendo la hilera de núcleos, que rodea una zona central que es el estroma de la vellosidad. Es en el estroma donde se aprecia una fuerte tinción de células dispersas que corresponden a macrófagos fetales.

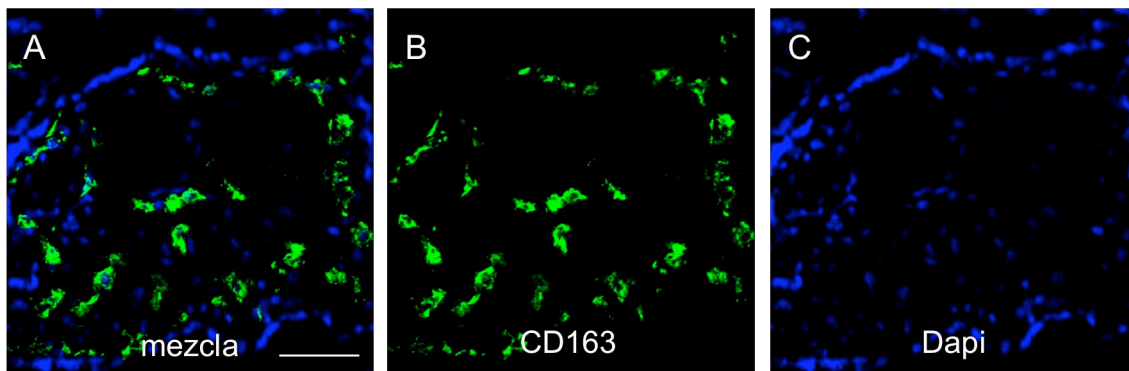


Figura 5. Localización por inmunofluorescencia en cortes de placenta humana a término del receptor scavenger CD163 (B), en verde, como marcador de macrófagos o células de Hofbauer. A, muestra la superposición del marcaje de CD163 con los núcleos teñidos con Dapi (C). Barra de escala: 50 μ m.

A finales de la década de los 90, se describió la presencia de miofibroblastos en la placenta humana a término (Graf et al., 1994; Graf et al., 1997; Kohnen et al., 1996). Estas células, también presentes en otros tejidos, fueron denominadas miofibroblastos ya que mantienen características tanto de fibroblastos como de células del músculo liso (Gabbiani et al., 1971; Serini y Gabbiani, 1999). Además de poseer capacidad contráctil (Serini y Gabbiani, 1999), los miofibroblastos poseen componentes de los microfilamentos, como la α -actina de músculo liso (α SMA), y de los filamentos intermedios, como la vimentina y la desmina (Iwasaki et al., 1987; Sati et al., 2007). Se ha descrito que la presencia de α SMA es el marcador más específico de estas células (Sati et al., 2007; Tomasek et al., 2002). Por esta razón se utilizó un anticuerpo frente a la α SMA para localizar células del músculo liso de los vasos, además de miofibroblastos, en cortes de placenta humana a término.

Como se observa en la figura 6, las células positivas al marcaje con α SMA, en verde, se encuentran principalmente localizados en áreas perivasculares y rodeando la pared de los vasos sanguíneos. Esta distribución tan característica también la han encontrado otros autores e incluso se ha podido determinar que estas células, y en concreto los miofibroblastos, se localizan en la capa media de las paredes de los vasos (Graf et al., 1994; Sati et al., 2007). Debido a esta distribución y a su capacidad contráctil, se ha sugerido que los miofibroblastos podrían modular el flujo sanguíneo a través de la placenta (Costa et al., 2006; Graf et al., 1994).

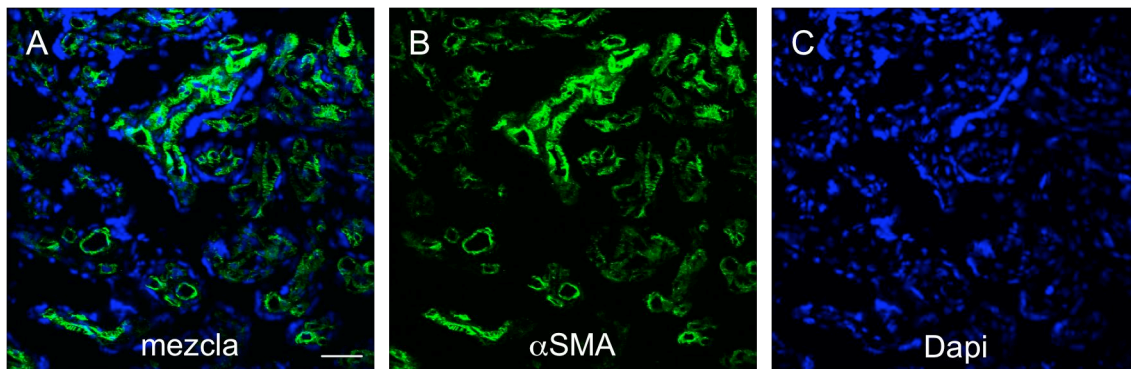


Figura 6. Localización por inmunofluorescencia en cortes de placenta humana a término de la proteína alfa-actina del músculo liso (α SMA) (B), en verde, como marcador de células de músculo liso. A, muestra la superposición del marcaje de α SMA con los núcleos teñidos con Dapi (C). Barra de escala: 50 μ m.

Una vez identificados los principales tipos celulares de las vellosidades coriónicas y visualizada su distribución tisular, pasamos a analizar la localización de los transportadores de aniones orgánicos colefilicos en cortes de placenta humana a término. Siempre que fue posible se utilizó CK7 como marcador específico de trofocitos (Haigh et al., 1999; Maldonado-Estrada et al., 2004; Muhlhauser et al., 1995).

En la figura 7 se muestra la inmunolocalización de OATP1B1. Se observa un ligero marcaje de OATP1B1, en rojo, en el estroma, principalmente en las células del endotelio capilar, aunque también hay señal en otras células del estroma que por su localización permite sugerir que se trate de células de Hofbauer. Sin embargo, no se detectó en el sincitiotrofoblasto, como lo demuestra la ausencia de co-localización con CK7, en verde. Estos resultados apoyan los obtenidos por RT-PCR cuantitativa donde no se encontraron niveles detectables del ARNm en trofocitos aislados. Sin embargo, a pesar de su baja expresión en la placenta, dada su localización, su papel en este órgano podría ser captar metabolitos desde la sangre fetal para su utilización por el

trofoblasto (estrón sulfato y/o DHEAS) o para su detoxificación tras atravesar el trofoblasto (ácidos biliares, bilirrubina no conjugada).

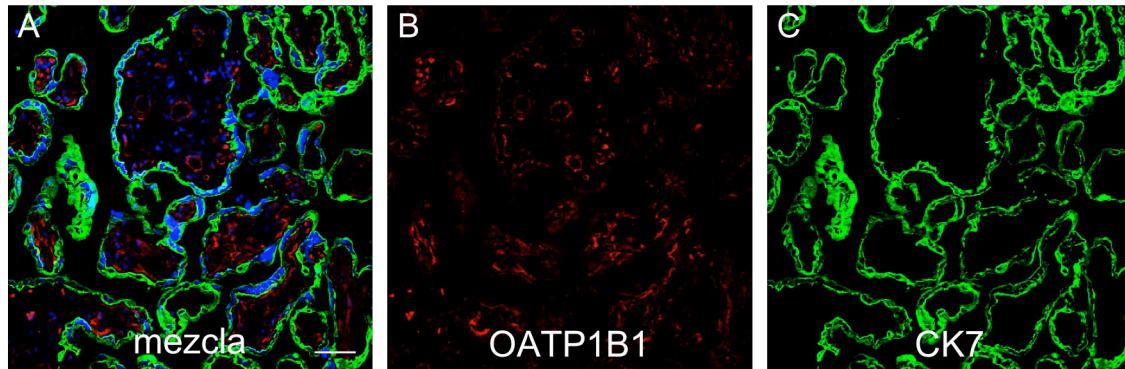


Figura 7. Localización por inmunofluorescencia en cortes de placenta humana a término del transportador OATP1B1 (B). Se utilizó la citoqueratina 7 (CK7) (C) como marcador de trofocitos. Los núcleos se tiñeron con Dapi. A muestra la superposición de las imágenes B y C. Barra de escala: 50 μ m.

En la figura 8 se muestra la inmunolocalización de OATP1B3. Se observa un patrón de distribución similar al encontrado para OATP1B1 aunque en este caso la señal fue más fuerte. OATP1B3 está marcado en rojo y se localiza principalmente en las células del endotelio capilar, aunque también hay señal en otras células del estroma, que podrían ser las células de Hofbauer. Además también se detectó un débil marcaje en el sincitiotrofoblasto, como lo demuestra la co-localización con CK7, en verde, representado con un color amarillo en algunas regiones del trofoblasto. Mientras estos resultados apoyan los obtenidos por PCR, donde se encontraron niveles bajos de su ARNm en trofocitos aislados, en trabajos previos no se detectó su expresión en la placenta total (Briz et al., 2003b; Ugele et al., 2003).

Estudios previos, han demostrado la capacidad de esta proteína para transportar bilirrubina no conjugada y ácidos biliares (Briz et al., 2006; Briz et al., 2003b), lo que sugiere que su función en la placenta podría estar relacionada con la detoxificación de estas moléculas retirándolas del compartimento fetal para su posterior eliminación por el hígado y riñón maternos.

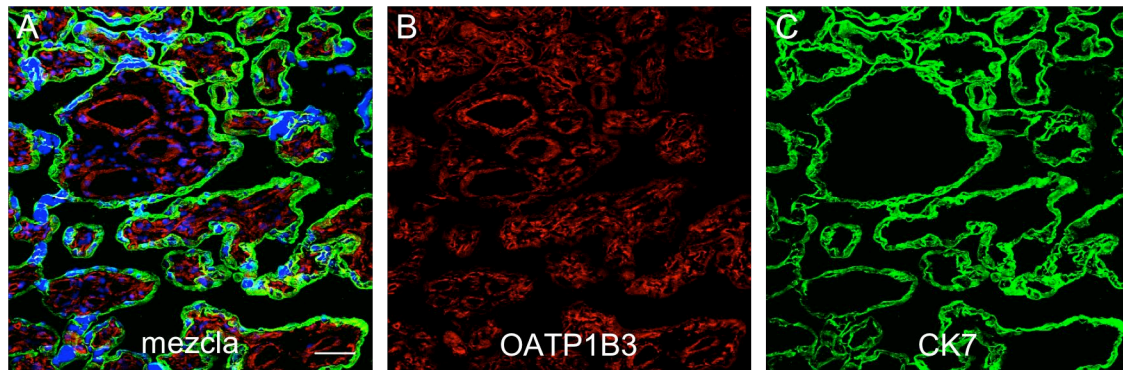


Figura 8. Localización por inmunofluorescencia en cortes de placenta humana a término del transportador OATP1B3 (B). Se utilizó la citoqueratina 7 (CK7) (C) como marcador de trofocitos. Los núcleos se tiñeron con Dapi. A muestra la superposición de las imágenes B y C. Barra de escala: 50 μ m.

En cuanto a la presencia y función de otras isoformas de OATPs, está bien caracterizada la expresión de OATP2B1 en la membrana basal del sincitiotrofoblasto de placentas humanas a término (St-Pierre et al., 2002). Está descrito que el trofoblasto humano depende del aporte de precursores (esteroles sulfatados) para la síntesis de estrógenos. Recientemente, se ha sugerido que en este proceso podría participar OATP2B1 junto con OAT4 (Ugele et al., 2003). En el último año, se ha determinado que OAT4 es el principal transportador implicado en el aporte de precursores para la síntesis de estrógenos mientras que OATP2B1 más bien contribuiría al aclaramiento de estrógenos sulfatados, como la estrona sulfato, de la sangre fetal (Ugele et al., 2008). Además, se ha detectado la presencia de un nuevo transportador, denominado OSCP1 (“organic solute carrier protein 1”), en el lado basal del sincitiotrofoblasto con capacidad para transportar esteroides sulfatados (Kobayashi et al., 2005; Kobayashi et al., 2007), indicando que posiblemente también participe en el transporte placentario de estas moléculas.

Sin embargo, poco se sabe de la captación de esteroides sulfatados desde el lado apical o materno del trofoblasto. A pesar de que OATP4A1 (anteriormente denominado OATPE) se localiza en la membrana apical del sincitiotrofoblasto parece que su función en este órgano está más relacionada con el transporte de hormonas tiroideas que con el transporte de esteroides sulfatados (Sato et al., 2003; Tamai et al., 2000). En los últimos dos años, se ha clonado y caracterizado un nuevo miembro de la familia de transportadores SLC10A, denominado SOAT (“sodium-dependent organic anion transporter”), con capacidad para transportar esteroides sulfatados e incluso ácidos biliares sulfatados de forma sodio dependiente (Geyer et al., 2007; Geyer et al., 2006), aunque su expresión en la placenta sólo se ha determinado a nivel de ARNm.

Una de las proteínas ABC cuya expresión en la placenta está muy elevada es BCRP (Allikmets et al., 1998; Ceckova et al., 2006). Cuando investigamos su localización en cortes de hígado humano (figura 9 A) y en cortes de placenta humana a término (figura 9 B), encontramos que en el hígado el marcaje fue más débil que en la placenta aunque se observó su localización en la membrana canalicular. Como cabía esperar, en la placenta, se encontró la misma distribución apical en el sincitiotrofoblasto.

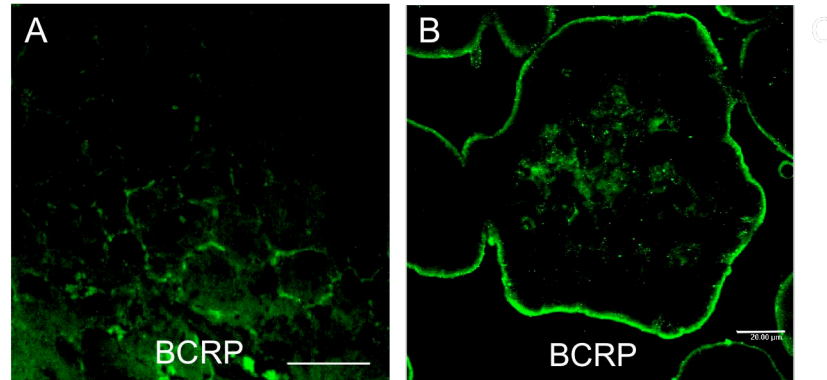


Figura 9. Localización por inmunofluorescencia del la bomba transportadora BCRP en cortes de hígado humano (A) y en cortes de placenta humana a término (B), Barra de escala: 20 μ m.

La mayor inmunoreactividad encontrada en la placenta respecto al hígado coincide con nuestros resultados obtenidos por RT-PCR cuantitativa y con estudios previos en los que se describió por primera vez su distribución tisular (Allikmets et al., 1998; Doyle et al., 1998). Su localización apical en los epitelios donde se ha detectado su expresión, incluido el sincitiotrofoblasto de la placenta humana, ya se había descrito con anterioridad (Litman et al., 2002; Maliepaard et al., 2001; Yeboah et al., 2006). A pesar de que en la última década se han hecho varios estudios funcionales que han demostrado que esta bomba es capaz de transportar una amplia gama de sustratos, desde agentes quimioterapéuticos hasta aniones orgánicos (Krishnamurthy y Schuetz, 2006; Vlaming et al., 2009), aún no se conoce con exactitud su papel fisiológico en este órgano.

Puesto que BCRP se localiza en la membrana apical del sincitiotrofoblasto, esto sugiere que esta bomba expulsaría compuestos que de otro modo atravesarían el sincitiotrofoblasto llegando al compartimento fetal. En este sentido se ha demostrado que BCRP es capaz de reducir la exposición fetal a fármacos mediante su expulsión a través de la barrera placentaria (Gedeon et al., 2008; Jonker et al., 2000; Kolwankar et al., 2005; Pollex et al., 2008; Staud et al., 2006). En los últimos años, se ha sugerido que dada su capacidad para expulsar de la célula esteroides sulfatados (Imai et al., 2003), podría regular la síntesis de estrógenos en la placenta a través de la

modulación de la concentración intracelular de sus precursores (Grube et al., 2007). Recientemente, se ha relacionado su presencia con la supervivencia del trofoblasto en situaciones de apoptosis inducida por citoquinas u otros activadores de la vía de señalización de la ceramida (Evseenko et al., 2007a; Evseenko et al., 2007b). Además, BCRP es un factor de supervivencia en situaciones de hipoxia, ya que expulsa compuestos tóxicos derivados del metabolismo del grupo hemo de las células (Krishnamurthy et al., 2004). Esto podría ser importante para la viabilidad del trofoblasto en determinadas complicaciones de la gestación. En conjunto, el estudio de la funcionalidad de BCRP en la placenta aún es un campo abierto a la investigación.

A pesar de encontrarnos una muy baja expresión de BSEP a nivel de ARNm en los trofocitos aislados, nos pareció importante determinar si este transportador se expresaba en otras células de la placenta puesto que se trata de una de las bombas ABC con mayor relevancia en el transporte de ácidos biliares en los hepatocitos. Sin embargo, cuando se investigó su localización en cortes de placenta humana a término (figura 10), no se detectó fluorescencia correspondiente a esta bomba ni en el sincitiotrofoblasto, marcado con CK7 en verde, ni en células del estroma.

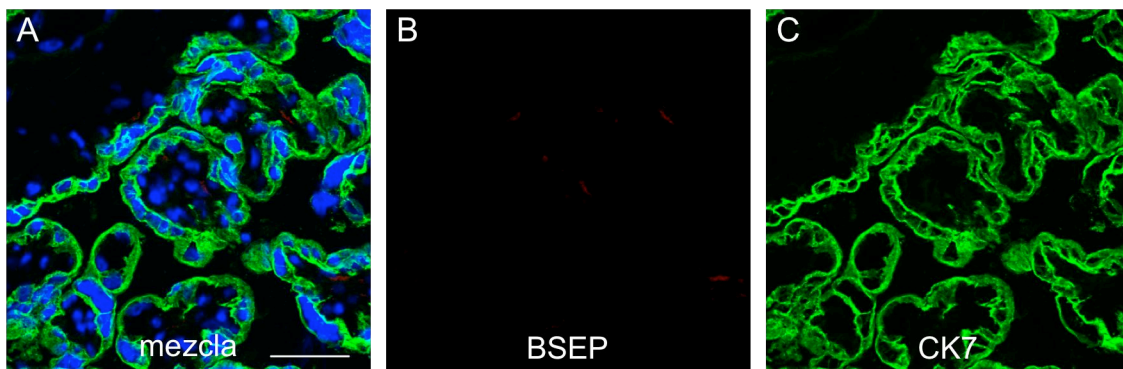


Figura 10. Localización por inmunofluorescencia en cortes de placenta humana a término de la bomba transportadora BSEP (B). Se utilizó la citoqueratina 7 (CK7) (C) como marcador de trofocitos. Los núcleos se tiñeron con Dapi. A muestra la superposición del marcaje de BSEP con la CK7. Barra de escala: 50 μ m.

Para confirmar la ausencia de BSEP en la placenta humana, decidimos detectar la proteína con otro anticuerpo por Western blot. Para ello, obtuvimos un anticuerpo monoclonal en nuestro laboratorio que denominamos USal-hBSEP-McAb-1 y que reconoce 13 aminoácidos de la región central de la proteína.

En la figura 11 se muestra una imagen representativa de la detección por Western blot de BSEP en crudo de membrana de hígado humano (calle 1), trofocitos aislados (calle 2) y placenta total (calle 3). El hígado se utilizó como referencia ya que, como hemos comentado, esta proteína está muy expresada en este tejido.

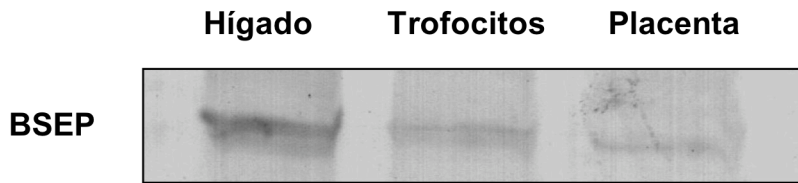


Figura 11. Imagen representativa de la detección por Western blot de la bomba transportadora BSEP en crudos de membrana obtenidos de hígado humano (calle 1), trofocitos aislados de placenta humana a término (calle 2) y de tejido coriónico humano a término (calle 3). La detección se llevó a cabo usando el anticuerpo monoclonal Usal-hBSEP-McAb-1 contra BSEP, obtenido en nuestro grupo de investigación. Se cargaron 30 μ g de proteína, en la calle 1, y 250 μ g de proteína/calle, en las calles 2 y 3. Tamaño de la banda: 140 kDa.

En esta figura se observa una banda de igual tamaño en las tres calles aunque, para poder ver esta banda, en los trofocitos y en la placenta se cargó 8 veces más cantidad de proteína que en el hígado. A pesar de ello, la intensidad de la banda en el hígado fue más elevada que en trofocitos y mucho más que en la placenta total.

Se sabe que el transporte de ácidos biliares a través del trofoblasto humano se realiza mediante un mecanismo ATP-dependiente (Marin et al., 2003). Sin embargo, y aunque BSEP es uno de los principales transportadores de ácidos biliares en el canalículo biliar, probablemente no ejerza un papel similar en la placenta ya que sus niveles de expresión son muy bajos.

Otra proteína de la familia ABC que podría participar en el transporte de aniones orgánicos a través de la placenta, es MRP4, cuya expresión a nivel de ARNm se encontró más elevada en trofocitos aislados que en el hígado. Cuando estudiamos su localización en cortes de placenta humana a término (figura 12), encontramos que MRP4, en verde, se localizaba en el sincitiotrofoblasto marcado con la CK7, en rojo, no detectándose señal en el estroma. Para confirmar el marcaje específico de la proteína, se utilizó suero pre-inmune de rata. Como se puede observar no se aprecia prácticamente marcaje apical procedente del suero pre-inmune de rata (imagen 12 E).

Hasta la fecha, no se había descrito la presencia de esta isoforma de MRP en la membrana apical del trofoblasto. Se ha demostrado que MRP4 media el eflujo de sales biliares monoaniónicas hacia la sangre mediante co-transporte con GSH (Rius et al., 2003; Zelcer et al., 2003). Recientemente se ha descrito que tiene mayor afinidad por los ácidos biliares conjugados con glicina y taurina y que su K_m por estos aniones orgánicos colefilicos, es similar a la de BSEP (Rius et al., 2006). Aunque su localización en los hepatocitos es sinusoidal (Rius et al., 2003), en la placenta podría estar localizado en la membrana apical del sincitiotrofoblasto por lo que dada la baja expresión de BSEP en este tejido, MRP4 podría ser una de las bombas ABC

implicadas en el transporte de ácidos biliares hacia la sangre materna para su posterior detoxificación.

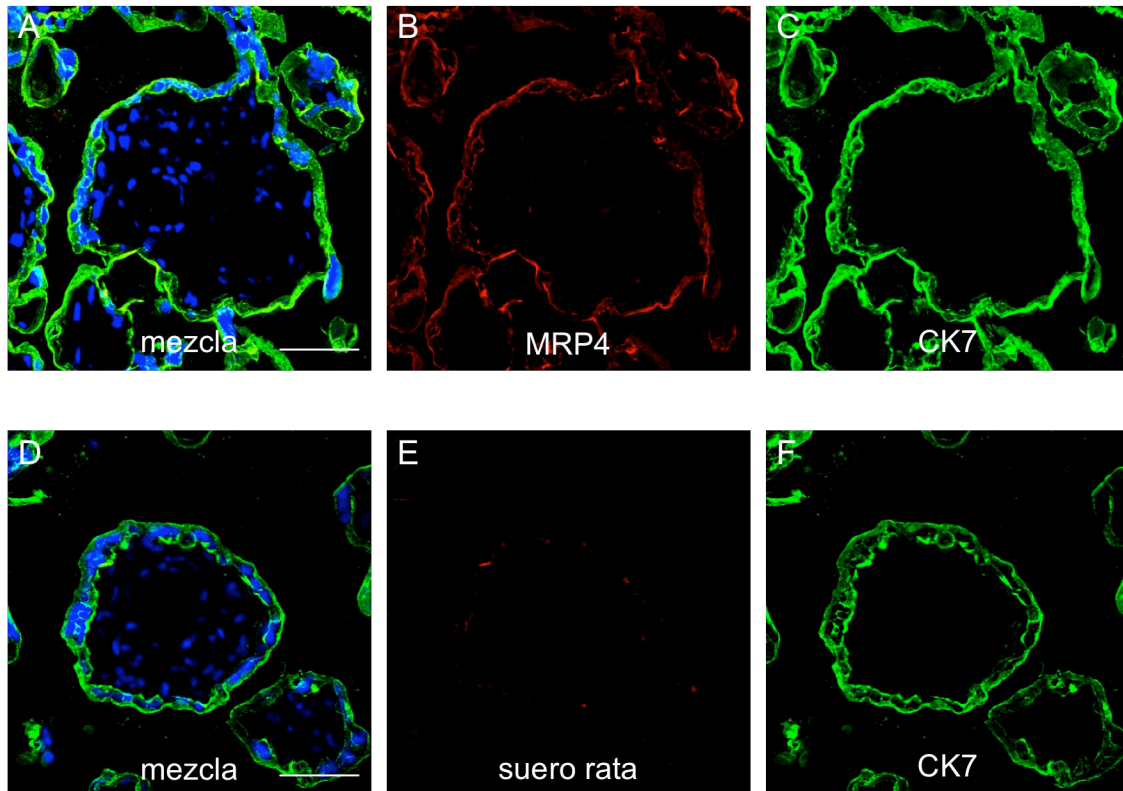


Figura 12. Localización por inmunofluorescencia en cortes de placenta humana a término de la bomba transportadora MRP4 (B). Se utilizó la citoqueratina 7 (CK7) (C, F) como marcador de trofocitos. Para determinar el marcaje inespecífico del anticuerpo contra MRP4 se utilizó suero pre-inmune de rata (E). Los núcleos se tiñeron con Dapi. A y D, muestran la mezcla del marcaje de MRP4 o del suero de rata con la CK7. Barra de escala: 50 μ m.

En relación a la localización de otras ABCC en la placenta, algunos autores han detectado MRP1 en la membrana basal del trofoblasto y en la membrana abluminal de las células del endotelio capilar en las vellosidades coriónicas (Nagashige et al., 2003; St-Pierre et al., 2000). Esta bomba se sabe que transporta una amplia variedad de compuestos endógenos y xenobióticos conjugados con ácido glucurónico, glutathione o sulfato (Konig et al., 1999). Puesto que la placenta posee enzimas conjugantes (Pasanen, 1999), considerando su localización en este órgano, MRP1 podría jugar un papel previniendo que se acumulasen xenobióticos en los trofocitos, mientras que MDR1 y BCRP, que se localizan en la membrana apical del trofoblasto, serían los principales responsables de la protección del feto a la exposición de xenobióticos (Jonker et al., 2000; Smit et al., 1999).

MRP2, sin embargo, se ha encontrado en la membrana apical del sincitiotrofoblasto (Meyer zu Schwabedissen et al., 2005; St-Pierre et al., 2000). Entre sus sustratos se encuentran metabolitos conjugados (Keppler et al., 1997; Keppler et al., 1996), incluyendo bilirrubina (Jedlitschky et al., 1997), por lo que se ha sugerido que podría contribuir a la eliminación de compuestos tóxicos del metabolismo fetal además de a la protección del feto frente a la exposición de sustancias nocivas.

Por otra parte, muchas sales biliares producidas por el hígado fetal están sulfatadas y amidadas (Nakagawa y Setchell, 1990) y serían sustratos para MRPs, en especial MRP1 y MRP2 (Jedlitschky et al., 1996; Jedlitschky et al., 1997), aunque no se puede descartar que otras ABC participen también en este transporte.

En conjunto, estos resultados confirman la presencia de transportadores de aniones orgánicos, involucrados en el transporte de compuestos colefílicos en el hígado, tanto en distintas estructuras del estroma como en el sincitiotrofoblasto de la placenta humana a término. Sin embargo, existen algunas diferencias entre ambos órganos, ya que mientras que en el hígado BSEP juegan un papel muy clave en la secreción de ácidos biliares, en la placenta su papel fisiológico no parece ser tan relevante. Por otra parte, MRP4 y BCRP, que al menos en circunstancias fisiológicas posiblemente participen en menor medida en la función excretora hepática de aniones orgánicos colefílicos, podrían jugar un importante papel en la transferencia placentaria de estos compuestos en dirección feto a madre.

4.1.3. Localización subcelular de los transportadores de aniones orgánicos colefílicos en las células BeWo y en trofocitos aislados de placentas humanas a término

Para avanzar en el estudio de la utilidad de las líneas derivadas de coriocarcinoma humano, como posibles modelos *in vitro* para estudios de regulación de la expresión y de la función de los transportadores de aniones orgánicos colefílicos presentes en la placenta, decidimos analizar la localización subcelular de estas proteínas en estas células y compararla con su localización en trofocitos aislados de placentas humanas a término.

De entre las tres líneas celulares escogimos las células BeWo ya que, como comentamos anteriormente, son un modelo *in vitro* bien establecido para estudiar la función excretora y de barrera de la placenta (Pattillo y Gey, 1968). Estas células presentan propiedades morfológicas y bioquímicas similares a las encontradas en el trofoblasto humano y son utilizadas por muchos grupos de investigación para llevar a cabo estudios de transporte de moléculas endógenas, como glucosa, transferrina e IgG (Cerneus y van der Ende, 1991; Ellinger et al., 1999; Vardhana y Illsley, 2002), y para caracterizar la actividad funcional de transportadores de membrana presentes en la placenta (Ceckova et al., 2006; Utoguchi et al., 2000)

Las figuras 13 y 14 muestran la localización de OATP1B3 y OATP2B1 (en color verde) respectivamente, en las células BeWo. Se utilizó un anticuerpo frente a la Na^+/K^+ -ATPasa (en rojo) como marcador de membrana plasmática. Para facilitar la interpretación de las imágenes, los núcleos se tiñeron con Dapi (en azul).

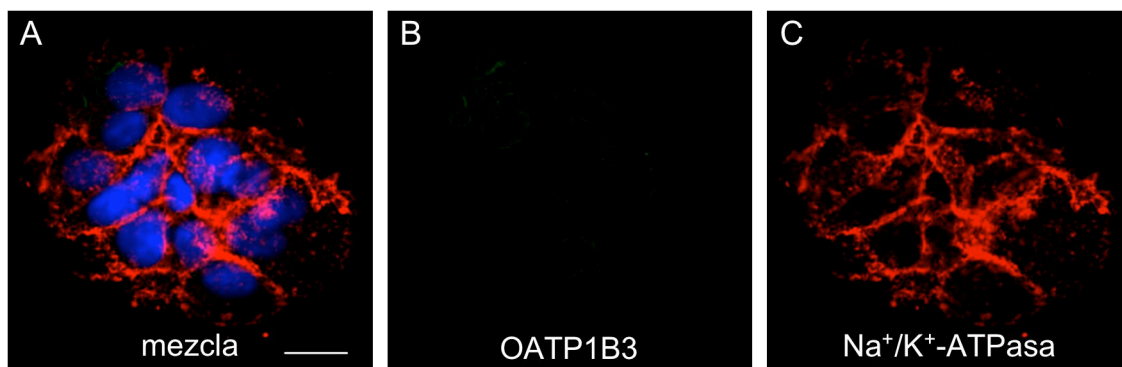


Figura 13. Localización por inmunofluorescencia en células BeWo, derivadas de coriocarcinoma humano, del transportador OATP1B3, marcado en verde (B). Se utilizó un anticuerpo frente a la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, en color rojo, para marcar la membrana plasmática de las células (A). A, muestra la superposición de las imágenes B y C. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barra de escala: 20 μm .

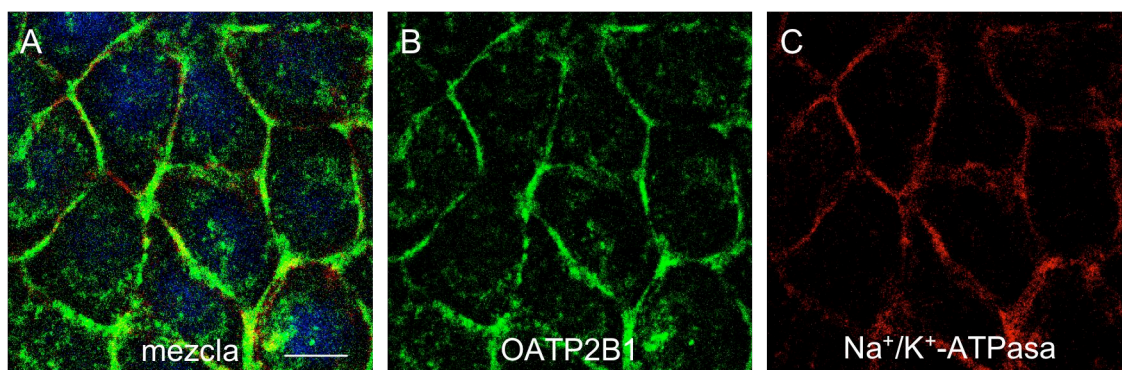


Figura 4. Localización por inmunofluorescencia en células BeWo, derivadas de coriocarcinoma humano, del transportador OATP2B1, marcado en verde. Se utilizó la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, en color rojo, para marcar la membrana plasmática de las células. A, muestra la mezcla del marcaje de OATP2B1 con la Na^+/K^+ -ATPasa. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barra de escala: 8 μm .

No se aprecia señal para OATP1B3 (figura 13 B) a pesar de que, a nivel de ARNm, encontramos que su expresión en estas células fue más elevada que la de OATP2B1. Sin embargo, en la figura 14 se observa un fuerte marcaje de membrana de OATP2B1

que co-localiza con la Na^+/K^+ -ATPasa (en amarillo, imagen 14 A). Esta diferencia podría deberse a la presencia de mecanismos de regulación post-transcripcional que controlen la síntesis de OATP1B3 y que sin determinados estímulos no se sintetice el péptido.

Al igual que en la placenta, BCRP es la proteína de la familia ABC que está más expresada en las líneas de coriocarcinoma a nivel de su ARNm. Su expresión en las células BeWo ya ha sido descrita con anterioridad (Bailey-Dell et al., 2001; Ceckova et al., 2006) y de hecho, estas células se han utilizado como modelo *in vitro* para el estudio funcional de BCRP en la placenta (Ceckova et al., 2006; Wang et al., 2008; Wang et al., 2006).

En la figura 15 se muestra la inmunolocalización de BCRP en estas células. En este caso no fue posible llevar a cabo un marcaje simultáneo con el anticuerpo frente a la bomba Na^+/K^+ -ATPasa ya que ambos anticuerpos primarios han sido obtenidos en ratón. Sin embargo, la señal obtenida parecía corresponder a una localización de membrana, no encontrándose señal en el citoplasma de estas células. Para facilitar la interpretación de la figura, se tiñeron los núcleos con yoduro de propidio (imagen 5A).

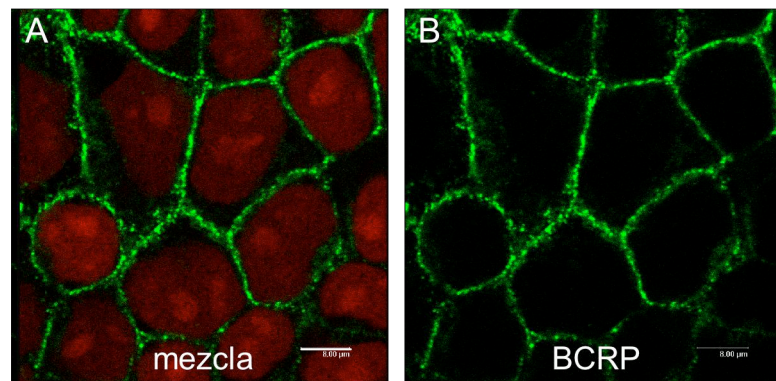


Figura 15. Localización por inmunofluorescencia en células BeWo, derivadas de coriocarcinoma humano, de la bomba transportadora BCRP. En verde se muestra el marcaje de la proteína. Los núcleos, de color rojo (A), se tiñeron con yoduro de propidio. Barra de escala: 8 μm .

A continuación analizamos la expresión de MDR1 a nivel de su proteína, ya que, como habíamos visto en el punto 4.1.1, es la isoforma de la subfamilia ABCB que presentó una mayor cantidad de transcritos tanto en las células BeWo como en trofocitos aislados.

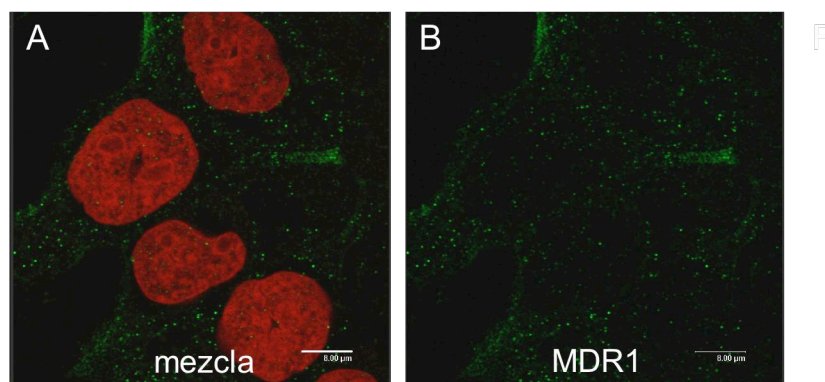


Figura 16. Localización por inmunofluorescencia en células BeWo, derivadas de coriocarcinoma humano, de la bomba transportadora MDR1. En verde se muestra el marcaje de la proteína. Los núcleos, de color rojo (A), se tiñeron con yoduro de propidio. Barra de escala: 8 μ m.

En la figura 16, se observa una señal muy tenue del transportador, que en su mayoría se encontraba en pequeños acúmulos intracelulares. Sólo en algunas zonas próximas a la membrana llegó a apreciarse una señal más intensa. En este caso, también se tiñeron los núcleos con yoduro de propidio para discriminar con más facilidad las distintas células de la imagen.

Este resultado contradice un poco los publicados por otro grupo de investigación (Utoguchi et al., 2000) que además de detectar la expresión de la proteína por Western blot, llevó a cabo estudios funcionales de la misma. Aunque, al igual que nosotros, otros investigadores (Atkinson et al., 2003; Evseenko et al., 2006) han encontrado niveles muy bajos de expresión de MDR1 en BeWo a nivel de proteína.

A continuación, analizamos la expresión de algunas isoformas de la subfamilia ABCC. En la figura 17 se muestra el resultado de la inmunodetección de MRP1 (B) y MRP2 (C), en las células BeWo. A pesar que sí se detectaron ambas isoformas a nivel de ARNm e incluso sus niveles de expresión en las células BeWo fueron más altos que los encontrados para las otras MRPs, por inmunofluorescencia no fue posible visualizar ninguna de las dos isoformas.

Del mismo modo, en la figura 18 se muestra el resultado del marcaje de las células BeWo con los anticuerpos frente a MRP3 y la Na^+/K^+ -ATPasa. Tampoco aquí se detectó MRP3 ni en la membrana ni en el interior celular.

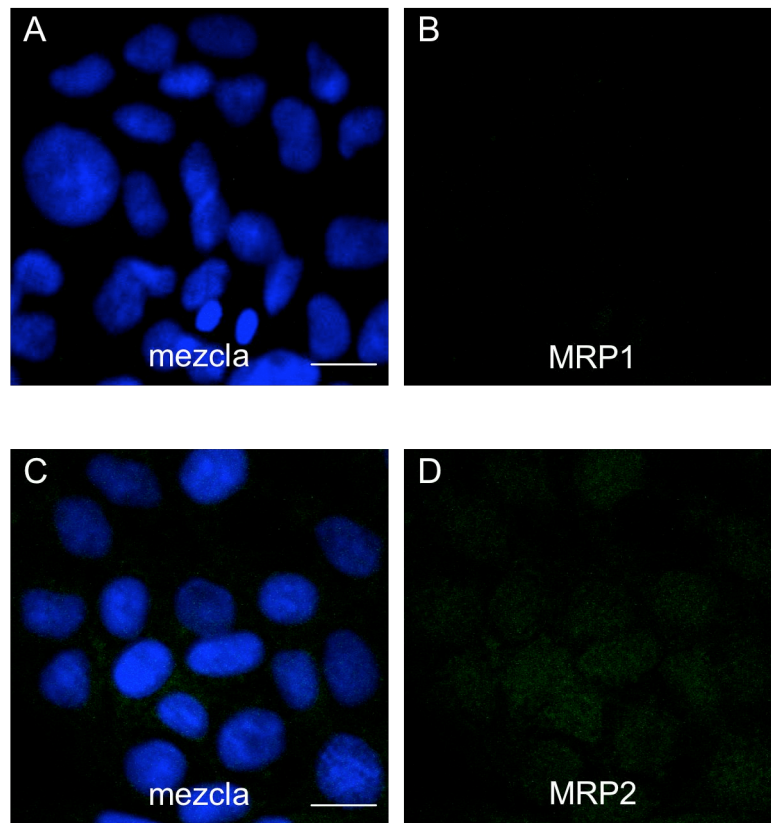


Figura 17. Localización por inmunofluorescencia en células BeWo, derivadas de coriocarcinoma humano, de los transportadores MRP1 (B) y MRP2 (D), en verde. A y C muestran la mezcla del marcaje de MRP1 y MRP2, respectivamente, con los núcleos teñidos con Dapi. Barra de escala: 20 μm .

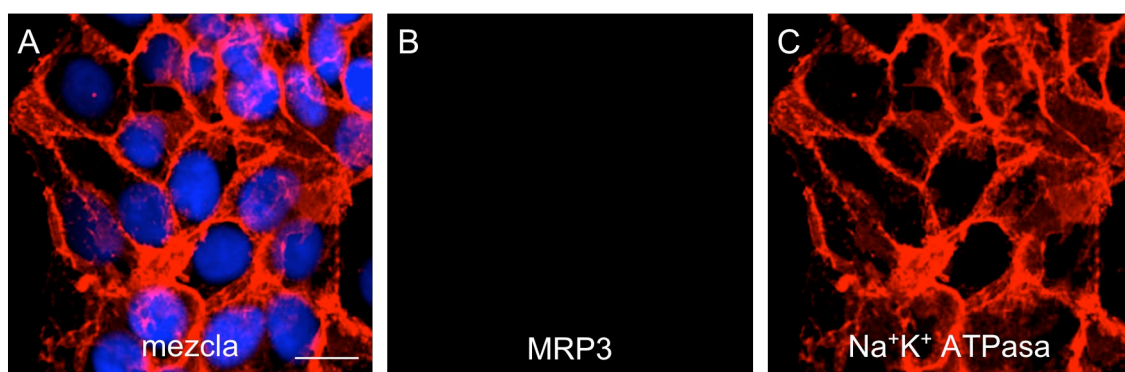


Figura 18. Localización por inmunofluorescencia en células BeWo, derivadas de coriocarcinoma humano, de la bomba transportadora MRP3, marcada en verde. Se utilizó la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa, en color rojo, para marcar la membrana plasmática de las células. A, muestra la mezcla del marcaje de MRP3 con la Na⁺/K⁺-ATPasa. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barra de escala: 20 μm .

La ausencia de señal correspondiente a las MRPs en las células BeWo por inmunofluorescencia coincide con los resultados encontrados por otros grupos donde a pesar de detectar los transcritos de estos genes, en estas células no se pudo detectar la expresión de las proteínas (Pascolo et al., 2003), probablemente debido a la presencia de mecanismos de regulación post-transcripcionales.

Se ha descrito que la expresión de MRP1 en la placenta humana va aumentando a lo largo de la gestación (Pascolo et al., 2003). Estudios realizados en células BeWo han demostrado que cuando las células crecían de forma no polarizada sobre placas, los niveles de expresión de MRP1 eran significativamente más bajos que cuando crecían de forma polarizada sobre soportes permeables o transwells (Pascolo et al., 2001; Pascolo et al., 2003). Esto podría justificar los bajos niveles de expresión que hemos encontrado ya que en este estudio las células se crecían sobre placas, de forma no polarizada.

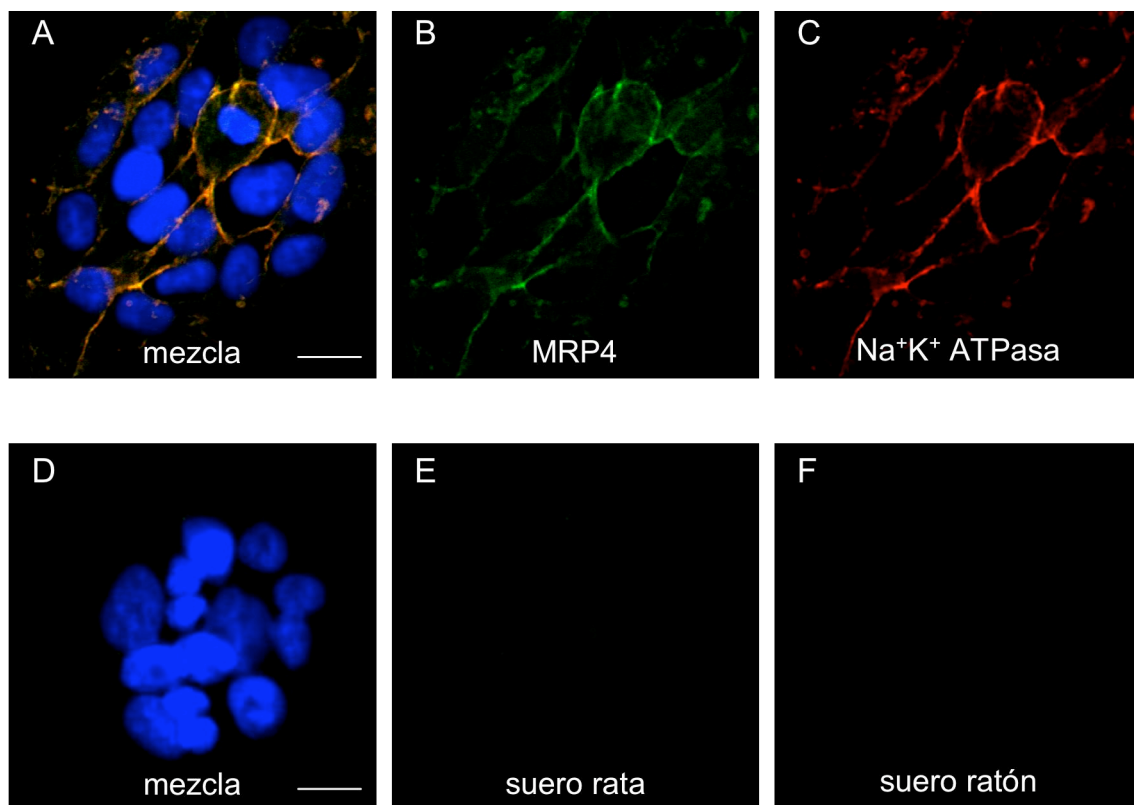


Figura 19. Localización por inmunofluorescencia en células BeWo, derivadas de coriocarcinoma humano, de la bomba transportadora MRP4 (B), marcada en verde. Se utilizó la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa (C, F), en color rojo, para marcar la membrana plasmática de las células. Para determinar el marcaje inespecífico de los anticuerpos contra MRP4 y Na⁺/K⁺-ATPasa se utilizaron sueros pre-inmunes de rata (E) y de ratón (F), respectivamente. A, muestra la mezcla del marcaje de MRP4 con la Na⁺/K⁺-ATPasa y D muestra la mezcla del marcaje de los sueros pre-inmunes. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barra de escala: 20 µm.

Respecto a la isoforma MRP4, en la figura 19 se muestra su localización en las células BeWo. Se observa un claro marcaje de la proteína en la membrana, en verde, que además co-localiza con la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (en amarillo, imagen 19A). Al igual que en la placenta, la incubación de las células con el suero obtenido antes de la inmunización (suero pre-inmune) de rata no produjo ninguna señal en estas células, indicando que se trata de una señal específica de la proteína.

Ésta es la primera vez que se ha descrito la presencia de MRP4 en células BeWo tanto a nivel de su ARNm como de su proteína. Otras MRPs, como MRP5, se han descrito con anterioridad en estas células (Pascolo et al., 2001).

A continuación, quisimos comparar estos resultados con la expresión de proteínas transportadoras de aniones orgánicos colefilicos en trofocitos recién aislados de placentas humanas a término.

Para distinguir los trofocitos recién aislados del resto de células presentes en el tejido placentario que pudieran haber sido purificadas a la vez, se utilizó, siempre que fue posible, CK7 como marcador específico de trofocitos (Haigh et al., 1999; Maldonado-Estrada et al., 2004; Muhlhauser et al., 1995). Puesto que, como ya se ha mencionado, esta proteína es un componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto, su marcaje es intracelular.

En la figura 20 se muestra una imagen representativa de la inmunolocalización de OATP2B1 en trofocitos humanos. Se observa una célula positiva para CK7 (en rojo) con un fuerte marcaje para OATP2B1 (en verde), que está principalmente localizado en la membrana plasmática aunque también hay marcaje en el citoplasma. En algunas zonas del interior celular se aprecia OATP2B1 co-localiza con CK7, representado en color amarillo (imagen 20 A).

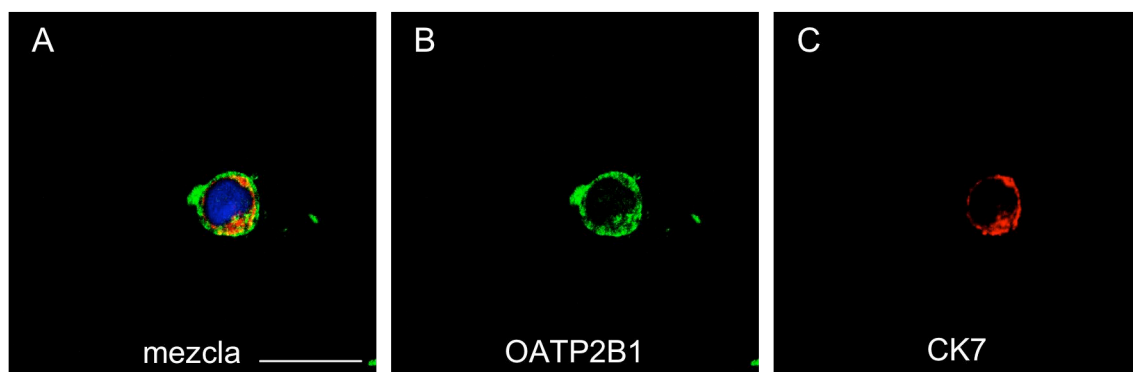


Figura 20. Localización por inmunofluorescencia en trofocitos aislados de placenta humana a término del transportador OATP2B1 (B), marcada en verde. Se utilizó la citoqueratina 7 (CK7) (C), en color rojo, como marcador de trofocitos. A, muestra la superposición de las imágenes B y C. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barra de escala: 20 μm .

Este resultado concuerda con los datos obtenidos en la cuantificación absoluta de los transcritos de este transportador en trofocitos, donde encontramos niveles altos de expresión de su ARNm y también, con los obtenidos previamente por otros autores, en cortes de placenta humana a término, que detectaron la presencia de OATP2B1 en la membrana basal del sincitiotrofoblasto (St-Pierre et al., 2002).

Respecto a la expresión de las isoformas de la subfamilia ABCC en los trofocitos aislados, en la figura 21 se muestra la inmunolocalización de MRP1 en estas células. En este caso no fue posible colocalizar con CK7 ya que ambos anticuerpos primarios están hechos en ratón. Como se puede observar, sólo se aprecia la tinción de los núcleos con Dapi y no se observa un marcaje claro procedente de la detección de MRP1 en estas células. Resultados similares se obtuvieron para MRP2 y MRP3 (datos no mostrados).

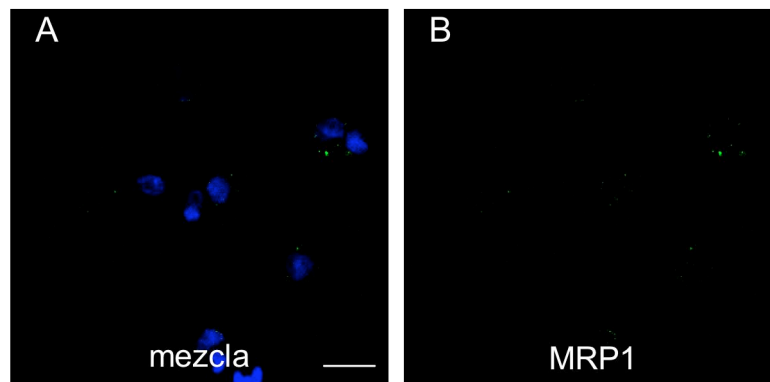


Figura 21. Localización por inmunofluorescencia en trofocitos aislados de placenta humana a término de la bomba transportadora MRP1 (B) marcada en verde. A, muestra la mezcla del marcaje de MRP1 con los núcleos teñidos con Dapi. Barra de escala: 20 μ m.

Desde hace varios años, existe cierta controversia sobre la expresión de MRP1 y MRP2 en la placenta humana. Así mientras unos autores encontraron niveles muy bajos, siendo difícil su localización (Evseenko et al., 2006; Pascolo et al., 2003), otros han detectado sus proteínas con claridad en el trofoblasto humano (Nagashige et al., 2003; St-Pierre et al., 2000). Por otra parte, a pesar de que a nivel de su ARNm la expresión de MRP3 en el trofoblasto es alta (Pascolo et al., 2003; St-Pierre et al., 2000), cuando se ha intentado detectar su proteína sólo se ha conseguido un tenue marcaje en el sincitiotrofoblasto mientras la mayor expresión se encontró en los vasos (St-Pierre et al., 2000).

En lo que se refiere a la presencia de MRP4 en trofocitos aislados de placenta humana a término, la figura 22 muestra una imagen representativa en la que se

observa una señal clara del transportador, marcado en verde, que co-localiza con la CK7, marcada en rojo.

Este resultado confirma la presencia de esta isoforma en la membrana de las células trofoblásticas que observamos en los cortes de placenta humana a término.

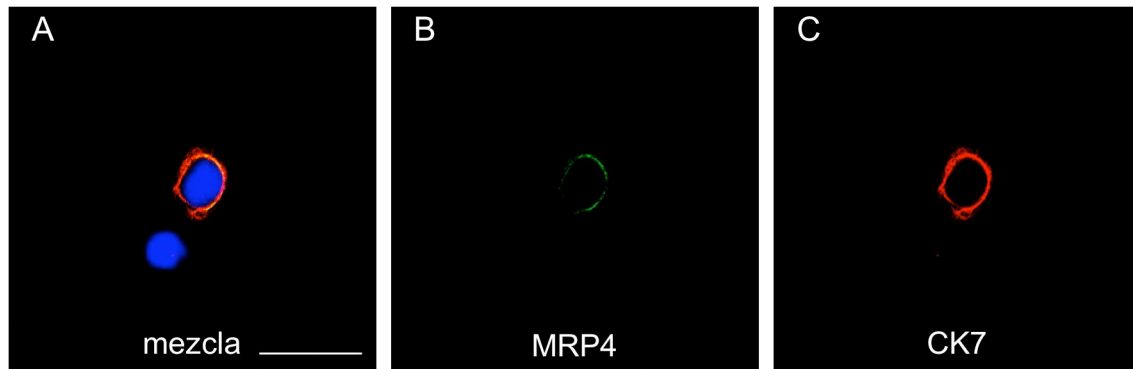


Figura 22. Localización por inmunofluorescencia en trofocitos aislados de placenta humana a término de la bomba transportadora MRP4 (B), marcada en verde. Se utilizó la citoqueratina 7 (CK7) (C), en color rojo, como marcador de trofocitos. A muestra la superposición de las imágenes B y C. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barra de escala: 20 μ m.

A la vista de los resultados, las líneas celulares derivadas de coriocarcinoma humano podrían ser un buen modelo *in vitro* para el estudio de la función excretora y de barrera de la placenta ya que, tanto a nivel de ARNm como de proteína, la expresión de los transportadores de aniones orgánicos colefilcos ha sido similar a la encontrada en los trofocitos.

4.1.4. Cuantificación de los niveles de expresión de receptores nucleares en cultivos primarios de trofocitos humanos y líneas celulares de coriocarcinoma humano.

Los receptores nucleares son factores de transcripción que tras unirse a un ligando adquieren la capacidad de activar o inhibir la transcripción de sus genes diana. Constituyen una superfamilia formada por más de 150 miembros (Blumberg y Evans, 1998; Kliewer et al., 1999; Mangelsdorf et al., 1995) y llevan a cabo su acción por unión a elementos respuesta en el promotor de sus genes diana.

Su patrón de expresión es característico de cada tipo celular y de cada periodo de la vida del individuo incluso de cada célula. Además, la respuesta a los diferentes ligandos depende del contexto, ya que puede variar según el tipo celular, el promotor, el elemento de respuesta al que se una y la presencia de otras señales (Smirlis, 2001).

En los últimos años se ha producido un desarrollo acelerado del conocimiento en el campo de los receptores nucleares en general y de los implicados en el control de funciones específicas del metabolismo hepático y de la función hepatobiliar en particular (Lu, 2001; Sinal, 2000).

Se conoce muy poco sobre la existencia y el papel de los receptores nucleares en células placentarias y menos aún en el caso concreto de los receptores nucleares relacionados con la regulación de la expresión de transportadores de aniones orgánicos colefilicos.

Los receptores no esteroideos o de tipo II como el receptor constitutivo de androstano (CAR, “constitutive androstane receptor”), el receptor nuclear de farnesoide o ácidos biliares (FXR, “farnesoid or bile acid nuclear receptor”), el receptor-alfa del ácido retinoico (RAR α , “retinoic acid receptor-alpha”) y el receptor nuclear de esteroides y xenobióticos (SXR, “steroid and xenobiotic nuclear receptor”), entre otros, actúan como heterodímeros obligados con el receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR). Al menos, RXR se ha detectado en el trofoblasto y se ha visto que la unión de PPAR γ a este receptor desencadena un conjunto de señales que contribuyen a la diferenciación del citotrofoblasto en sincitiotrofoblasto (Tarrade, 2001).

Para ampliar el estudio acerca de la presencia de receptores nucleares implicados en la regulación de la expresión de proteínas transportadoras de aniones orgánicos colefilicos en la placenta, decidimos cuantificar, por RT-PCR cuantitativa a tiempo real, sus niveles de ARNm en trofocitos humanos recién aislados y compararlos con la expresión en las líneas celulares derivadas de coriocarcinoma humano.

Las secuencias de los nucleótidos de los cebadores utilizados en las reacciones de RT-PCR cuantitativa a tiempo real están recogidas en la tabla 3 del apartado 3.6.3. de Material y Métodos.

Las rectas patrón obtenidas para cada receptor así como los valores de R^2 y la eficacia calculada para cada reacción, están recogidas en la tabla 4. En todos los casos el valor de R^2 fue próximo a 1,0 e incluso para la pareja de cebadores que amplifican una región del gen *NR1I3* que codifica para CAR, el valor fue exactamente de 1,0. La eficacia calculada de la PCR fue superior al 85% en todos los casos, oscilando entre el 85,1% que se obtuvo para la amplificación del gen que codifica para el receptor nuclear SXR y el 96,1% encontrado para el factor nuclear de hepatocitos-1 α (HNF1 α , “hepatocyte nuclear factor-1 α ”).

Tabla 4. Rectas patrón obtenidas para cada pareja de cebadores ensayados.

Proteína/Gen	Recta Patrón	R ²	Eficacia
CAR (<i>NR1I3</i>)	$y = 38,53 - 3,68 \times \log_{10}(N)$	1,0000	86,9%
FXR (<i>NR1H4</i>)	$y = 39,68 - 3,59 \times \log_{10}(N)$	0,9984	89,9%
HNF1α (<i>TCF1</i>)	$y = 38,01 - 3,42 \times \log_{10}(N)$	0,9997	96,1%
HNF4 (<i>NR2A1</i>)	$y = 35,55 - 3,43 \times \log_{10}(N)$	0,9994	95,7%
RARα (<i>NR1B1</i>)	$y = 36,10 - 3,44 \times \log_{10}(N)$	0,9962	95,3%
SHP (<i>NR0B2</i>)	$y = 38,71 - 3,54 \times \log_{10}(N)$	0,9997	91,6%
SXR (<i>NR1I2</i>)	$y = 40,36 - 3,55 \times \log_{10}(N)$	0,9980	85,1%

R², coeficiente de correlación. N, número de copias de cada fragmento.

Eficacia = $(10^{(-1/P)} - 1) \times 100$, donde P es la pendiente de la recta.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de la abundancia absoluta del ARNm de los receptores nucleares, expresada como número de copias del gen de interés por cada 10^6 copias del ARNr 18S. Como valor de referencia de los niveles de expresión de estas proteínas se incluyó el hígado humano adulto.

Como puede observarse, en trofocitos y en las líneas celulares los niveles más bajos de expresión que se obtuvieron fueron para los factores de transcripción HNF1 α y HNF4 e incluso, no llegó a detectarse en trofocitos HNF1 α . Por el contrario, la abundancia de ARNm del receptor nuclear FXR y la del factor de transcripción SHP ("small heterodimer partner"), fue la más alta detectada en estas células. De hecho, la cantidad de transcritos que se detectó en las células BeWo y JAr fue superior a la encontrada en trofocitos e hígado. Finalmente, CAR, RAR α y SXR presentaron valores intermedios de expresión tanto en trofocitos como en las líneas celulares siendo estos valores iguales o inferiores a los detectados en el hígado adulto.

Los factores de transcripción SXR, FXR, SHP y HNF1 α , regulan la expresión de algunos de los transportadores de aniones orgánicos colefílicos analizados en el apartado anterior (Akiyama y Gonzalez, 2003; Chawla et al., 2001; Kullak-Ublick et al., 2004). HNF1 α está presente principalmente en hepatocitos, pero también puede encontrarse en células epiteliales de otros órganos como en los túbulos renales, estómago, intestino delgado, colon y páncreas. Este factor de transcripción juega un papel importante en la regulación de las enzimas hepáticas involucradas en el metabolismo de fármacos, ácidos grasos y ácidos biliares (Chawla et al., 2001).

Además, regula la expresión de transportadores de aniones orgánicos como OATP1B1 y NTCP (Akiyama y Gonzalez, 2003). Sin embargo, ni estos transportadores ni HNF1 α están expresados en la placenta.

Tabla 5. Cuantificación absoluta de la expresión del ARNm de receptores nucleares que regulan la expresión de transportadores de aniones orgánicos colefilicos.

Proteína/Gen	Hígado	Trofocitos	BeWo	JAr	Jeg-3
CAR (<i>NR1I3</i>)	80,6 \pm 2,92 ^a	3,53 \pm 0,25	9,6 \pm 0,66	25,8 \pm 1,44 ^a	56,8 \pm 1,17 ^a
FXR (<i>NR1H4</i>)	397 \pm 39,7 ^a	246 \pm 8,8	518 \pm 35,3 ^a	680 \pm 39,1 ^a	81,5 \pm 12,2 ^a
HNF1α (<i>TCF1</i>)	15,4 \pm 2,66 ^a	ND	1,78 \pm 0,53	4,31 \pm 3,02	0,28 \pm 0,02
HNF4 (<i>NR2A1</i>)	11,1 \pm 2,75 ^a	0,23 \pm 0,07	0,17 \pm 0,01	0,37 \pm 0,06	0,33 \pm 0,07
RARα (<i>NR1B1</i>)	18,5 \pm 2,55	18,8 \pm 0,68	12,2 \pm 1,06	23,8 \pm 1,56	120 \pm 4,49 ^a
SHP (<i>NR0B2</i>)	42,3 \pm 6,74 ^a	74,2 \pm 0,96	146 \pm 7,69 ^a	815 \pm 62,4 ^a	32,3 \pm 0,53 ^a
SXR (<i>NR1I2</i>)	387 \pm 11,7 ^a	10,3 \pm 1,59	11,9 \pm 1,45	48,5 \pm 4,25 ^a	4,19 \pm 0,4

Los valores, normalizados por el contenido de ARNr 18S, están expresados como número de copias del gen de interés por cada 10⁶ copias del ARNr 18S determinadas en cada muestra. La RT-PCR cuantitativa se realizó por triplicado a partir de muestras obtenidas de cuatro cultivos diferentes. Los valores son medias \pm EEM. ND, no detectable. ^a, p < 0,05 al comparar los niveles de expresión respecto a trofocitos por el test de Bonferroni para valores múltiples.

SXR es el ortólogo humano del receptor de roedores Pxr. Este receptor nuclear se expresa preferentemente en el hígado y se activa por diversos pregnanos sintéticos y naturales (Akiyama y Gonzalez, 2003). Dentro de sus activadores, se encuentran algunos ácidos biliares secundarios, como el ácido litocólico (Staudinger et al., 2001). Una vez activado, estimula la expresión de enzimas implicadas en la detoxificación de compuestos tóxicos (CYP3A) y de algunas bombas ABC (MRP2 y MRP3) para favorecer la excreción y evitar la acumulación en la célula de ácidos biliares y xenobióticos (Kullak-Ublick, 2003; Staudinger et al., 2001). Sus niveles de expresión en trofocitos aislados y en las líneas celulares, aunque más bajos que en el hígado, podrían ser compatibles con un posible papel de este receptor nuclear como sensor para prevenir la acumulación de compuestos que pudieran ser tóxicos de la misma forma a como actúa en el hígado (Akiyama y Gonzalez, 2003).

Por otro lado, CAR y RAR α , que regulan la expresión de varios transportadores y enzimas de detoxificación (Chawla et al., 2001; Karpen, 2002), están también expresados en el trofoblasto.

FXR está muy expresado en hígado, intestino, riñón y en las glándulas adrenales (Akiyama y Gonzalez, 2003). Ciertos ácidos biliares y sus respectivos metabolitos conjugados son ligandos endógenos de FXR. El gen que codifica para SHP es la principal diana de FXR en el hígado. La activación de FXR tras su unión a ácidos biliares induce la expresión de SHP y esto conlleva por un lado, la inhibición de la expresión de varios genes implicados en la captación y en la síntesis *de novo* de ácidos biliares, mientras que por otro lado, aumenta la expresión de algunas bombas canaliculares (Akiyama y Gonzalez, 2003; Kullak-Ublick et al., 2004; Nagano et al., 2004). De este modo se favorece la excreción biliar de ácidos biliares. Nuestros resultados demuestran que FXR y SHP están muy expresados en trofocitos y en las líneas celulares, por lo que tal vez podrían jugar un papel en el control de la función excretora de tipo hepatobiliar de la placenta. Esto concuerda con estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación donde tras inducir una hipercolanemia en las madres por la ligadura del conducto biliar común en ratas gestantes, se les trataba con el ácido ursodesoxicólico dando como resultado un aumento de la expresión placentaria de varias isoformas de Oatps y de Mrps (Serrano et al., 2003).

4.2. EXCRECIÓN DE BILIVERDINA POR EL BINOMIO PLACENTA-HÍGADO MATERNO

En el feto y en el recién nacido hay una mayor actividad catabólica del grupo hemo que en el adulto, debido principalmente a que la vida media de sus eritrocitos es más corta. En la mayoría de los mamíferos el grupo hemo es metabolizado a bilirrubina (BR), siendo la biliverdina (BV) un producto intermedio en esta vía de degradación.

La enzima biliverdina reductasa IX α (BVR α), expresada en varios tejidos entre los que se incluye la placenta (McCoubrey et al., 1995; McDonagh et al., 1981), es la responsable de reducir la BV-IX α , un pigmento hidrosoluble, no tóxico y fácilmente excretable (Himes y Cornelius, 1975; Lin et al., 1974; Munoz et al., 1986), a BR-IX α que es poco soluble en agua, tóxica si se acumula en el sistema nervioso central (Gourley, 1997) y que para su excreción requiere ser conjugada con ácido glucurónico por la enzima uridín difosfato glucuronosil transferasa (UDPG-transferasa) (Bosma et al., 1994; Jedlitschky et al., 1997).

Debido a la inmadurez de la función excretora del hígado fetal y a la baja actividad de la enzima UDPG-transferasa en este órgano (Kawade y Onishi, 1981; Kishi et al., 2008), durante la vida intrauterina la placenta es la principal ruta de excreción de los pigmentos biliares fetales hacia la sangre materna.

Durante muchos años la BV y la BR se habían considerado meros productos de desecho del metabolismo del grupo hemo. En los últimos 20 años se han hecho avances en el estudio de la relevancia fisiológica de estos pigmentos biliares en los que se ha demostrado que estos compuestos poseen propiedades antioxidantes (Bulmer et al., 2008). Sin embargo, sus efectos beneficiosos se consiguen cuando se mantienen a bajas concentraciones ya que se ha visto que la BR puede causar daño irreversible, incluso la muerte, cuando se acumula en el cerebro, siendo este efecto especialmente dañino en el SNC del feto en desarrollo (Gourley, 1997).

Se ha sugerido que una de las ventajas evolutivas de la conversión de BV en BR podría ser la facilidad de ésta para difundir a través de las membranas placentarias debido a su mayor lipofilia y a la existencia de un gradiente de concentración desde el feto hacia la madre, evitando así la acumulación de los pigmentos hemoderivados en el feto (Monte et al., 1995; Ostrow et al., 1994; Schmid, 1976). Sin embargo, en la última década, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo estudios que apoyan la existencia de un mecanismo no difusional para la transferencia placentaria de BR no conjugada con características vectoriales en dirección feto a madre (Briz et al., 2003a; Serrano et al., 2002). Además, se ha comprobado que la BR se transfiere sin sufrir ninguna biotransformación durante su paso por la placenta (Briz et al., 2003a).

Existen pocos trabajos sobre el transporte de BV a través de este órgano. Se ha descrito que en cobayas la BV no atraviesa la placenta sin ser previamente reducida a BR (McDonagh et al., 1981). Por otra parte, se ha comprobado que la BV es capaz de

inhibir la transferencia placentaria de BR en la rata (Briz et al., 2003a). Con estos indicios nos planteamos estudiar cuáles de los mecanismos de transporte involucrados en la captación de aniones orgánicos en el hígado podrían participar en el transporte de la BV fetal en la placenta y analizar los niveles de expresión de la Bvr α en el eje hígado fetal-placenta-hígado materno que estaría implicada en la biotransformación de la BV fetal en BR.

4.2.1. Transporte de biliverdina por el binomio placenta-hígado materno

Para investigar la captación y el procesamiento de la BV por el binomio placenta-hígado materno se utilizó el modelo experimental de placenta de rata perfundida *in situ*, puesto a punto anteriormente en nuestro grupo de investigación (Briz et al., 1998).

El modelo consiste en un sistema de perfusión de paso único donde una placenta de rata, en el día 21 de la gestación, es perfundida *in situ* a través de la arteria umbilical. La salida por la vena umbilical se facilita mediante un corte en este vaso. El riego sanguíneo en el lado materno de la placenta se mantiene intacto. De este modo se asegura un buen intercambio de oxígeno y de nutrientes al trofoblasto durante el periodo experimental (90 min), además de unas condiciones adecuadas para la transferencia placentaria de sustancias desde la sangre fetal a la materna. El flujo de perfusión por la arteria umbilical se fijó en 0,5 ml/min y la presión se mantuvo constante e inferior a 20 cm de agua durante todo el periodo experimental.

En la figura 23 está representada la evolución temporal de la secreción biliar de BV y BR tras la administración de 1 μ mol de BV durante 5 min a través de la arteria umbilical. En la bilis materna, no se detectaron niveles apreciables de BV a lo largo de todo el periodo experimental. Sin embargo, a partir del minuto 12 se observó un aumento progresivo de la cantidad de BR, que alcanzó un pico de secreción alrededor del minuto 40. Al final del periodo experimental, la secreción acumulada de BR en la bilis materna fue de $15,5 \pm 3,2$ nmol, mientras que de BV sólo se encontraron $0,13 \pm 0,05$ nmol. Esto significa que tan sólo un 1,6% de la dosis de BV administrada se recuperó, principalmente en su forma reducida como BR, en la bilis.

Estos resultados no descartan que también se esté transfiriendo BV a través de la placenta, ya que en condiciones normales este pigmento no se detecta en la bilis debido a la alta actividad Bvr α que tiene el hígado adulto (McCoubrey et al., 1995; McDonagh et al., 1981).

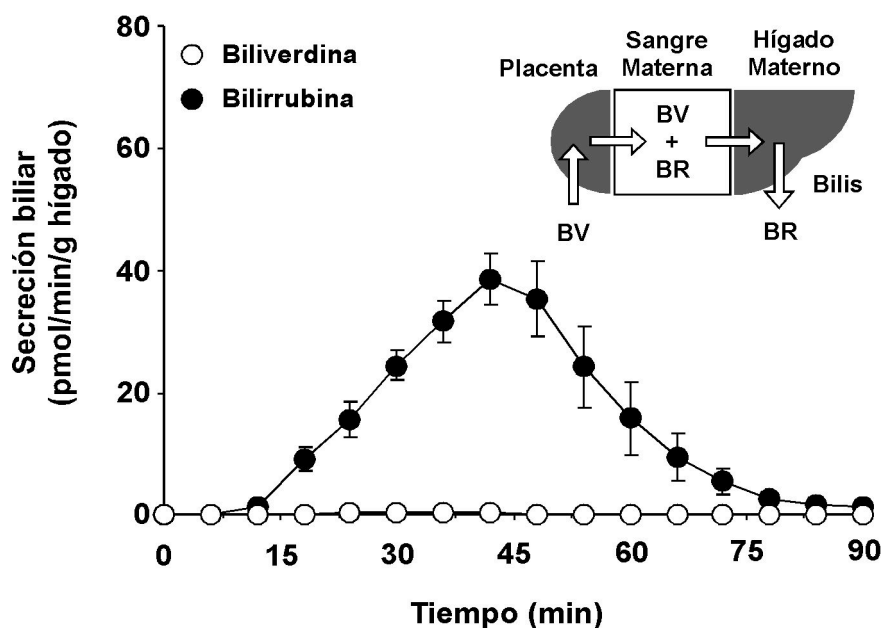


Figura 23. Evolución temporal de la secreción biliar de biliverdina (BV) y bilirrubina (BR) tras la administración de 1 μ mol de BV durante 5 min a través de la arteria umbilical de placentas de rata perfundidas *in situ* el día 21 de la gestación (n= 5). Los valores representados son medias \pm EEM. En la parte superior está inserto un esquema representativo del modelo experimental.

Para saber si se transfería BV a través de la placenta, decidimos aislar el hígado y los riñones maternos de la circulación general para prevenir la biotransformación del pigmento que, tras atravesar la placenta, pudiera alcanzar la circulación materna. Como se explica en el apartado 3.3.2. de Material y Métodos, justo antes de que se administrara 1 μ mol de BV por la arteria umbilical, se aislaban rápidamente ambos órganos mediante ligaduras previamente colocadas alrededor de la vena porta, la arteria hepática y las arterias y venas renales.

En la figura 24 A se muestra la concentración sérica de glucosa y de urea, parámetros utilizados como indicadores de la viabilidad de los animales durante el periodo experimental. El comienzo del deterioro de los animales se observó a partir del minuto 20 cuando se monitorizó un aumento de la uremia y una disminución de la glucemia en el suero materno. Por tanto, el periodo de recogida de muestras se fijó entre el minuto 0, justo después de la administración de la BV por la arteria umbilical, hasta los 20 min posteriores.

En la figura 24 B, se muestra la concentración de BV y de BR en el suero materno después de administrar o no un bolo de 1 μ mol de BV por la arteria umbilical. Se observa que, tras administrar el bolo de BV los niveles de este pigmento en el suero materno subieron rápidamente hasta alcanzar un pico máximo a los 10 min, antes de que se detectase el inicio del deterioro general. El incremento de BR se encontró retrasado en el tiempo, entre 5 y 10 minutos, respecto a la aparición de la BV.

Coincidiendo con el aumento progresivo de la concentración de BR se observó una disminución brusca de la BV sérica a partir del minuto 10.

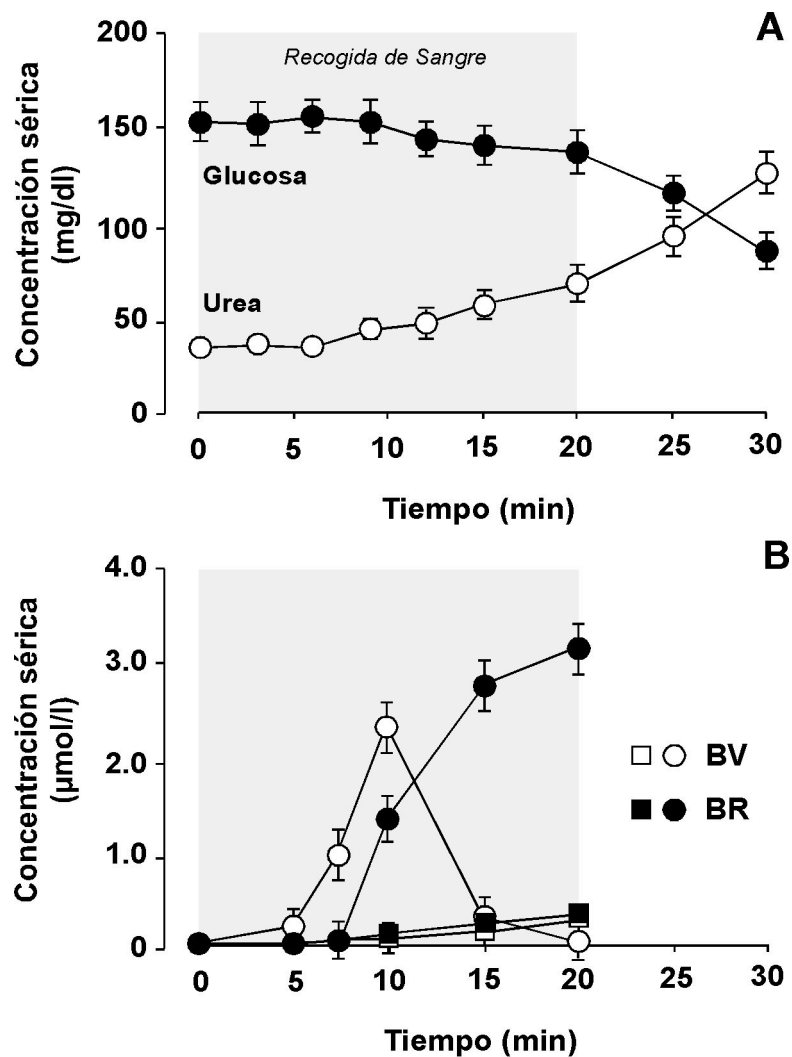


Figura 24. (A) Evolución temporal de la glucemia (círculos negros) y de la uremia (círculos blancos) determinadas durante 30 min inmediatamente después del aislamiento vascular del hígado y los riñones maternos mediante ligaduras previamente colocadas alrededor de la vena porta, la arteria hepática y las arterias y venas renales. (B) Evolución temporal de la concentración de biliverdina (BV) y bilirrubina (BR) en muestras de suero materno recogidas durante 20 min. Inmediatamente después de aislar de la circulación general el hígado y los riñones maternos, se administró (círculos, $n=5$) o no (cuadrados, $n=4$) 1 μmol de BV durante 5 min a través de la arteria umbilical de la placenta de ratas perfundidas *in situ* el día 21 de la gestación. Los valores están expresados como medias \pm EEM.

La cantidad de pigmentos biliares encontrada en la sangre materna procedía de la BV administrada a través de la arteria umbilical ya que cuando no se administró el bolo de BV no se detectó una acumulación en sangre de estos pigmentos. Únicamente se

detectaron trazas de BR que en ningún momento llegaron a ser superiores a 0,3 μ M en el suero materno (figura 24 B).

La magnitud del aumento de la concentración de BV y BR en el suero materno es consistente con la cantidad de BR secretada a bilis cuando se administró la BV a animales con las circulaciones renal y hepática intactas.

Estos experimentos ponen de manifiesto que únicamente una pequeña parte de la cantidad de BV fetal que entra la placenta de rata es rápidamente liberada sin biotransformar hacia la madre. Estudios previos realizados en cobayas sólo habían detectado BR en el suero materno tras administrar BV en el lado fetal (McDonagh et al., 1981). Esta diferencia con nuestros resultados podría deberse a que en su caso los animales mantenían la circulación hepática intacta por lo que la BV podría estar siendo retirada rápidamente de la circulación general y reducida por el hígado materno.

Para estudiar la capacidad que tiene el hígado materno para reducir la BV fetal que podría atravesar la placenta se inyectaron 0,1 μ mol de este pigmento directamente en la circulación materna a través de la vena yugular. Esta cantidad era aproximadamente el 10% de la cantidad de BV que se administraba por la arteria umbilical, pero casi 10 veces más que la cantidad que alcanzaba la sangre materna. En la figura 25 está representada la evolución temporal de la secreción biliar de BV y de BR tras la administración endovenosa del bolo de BV.

Se observa que una pequeña parte de la BV administrada aparece rápidamente en bilis sin ser previamente reducida, posiblemente porque la cantidad captada por el hígado excede la capacidad de reducción de la Bvr α hepática (Ramonas et al., 1981). Como cabía esperar, el pigmento mayoritario fue de nuevo la BR, cuyo pico de secreción apareció alrededor del minuto 20. Al final del periodo experimental se recuperaron $61,7 \pm 3,6$ nmol de BR en bilis y un total de $15,7 \pm 4,0$ nmol de BV. En conjunto, se excretó a bilis un 80% de la BV inyectada.

Al comparar la evolución de la secreción biliar que se obtuvo tras la administración de BV en el compartimento fetal (figura 23), se observó un retraso en la aparición del pico de secreción de la BR de unos 20 minutos y una caída más lenta de la secreción de BR en la bilis materna. Esto indicaba que la transferencia de estos pigmentos a través de la placenta era menos eficaz que a través del hígado materno.

En conjunto, estos experimentos *in vivo* sugieren que existe un pequeño transporte de BV desde la placenta a la madre y/o que en la placenta la biotransformación de la BV a BR es muy eficaz.

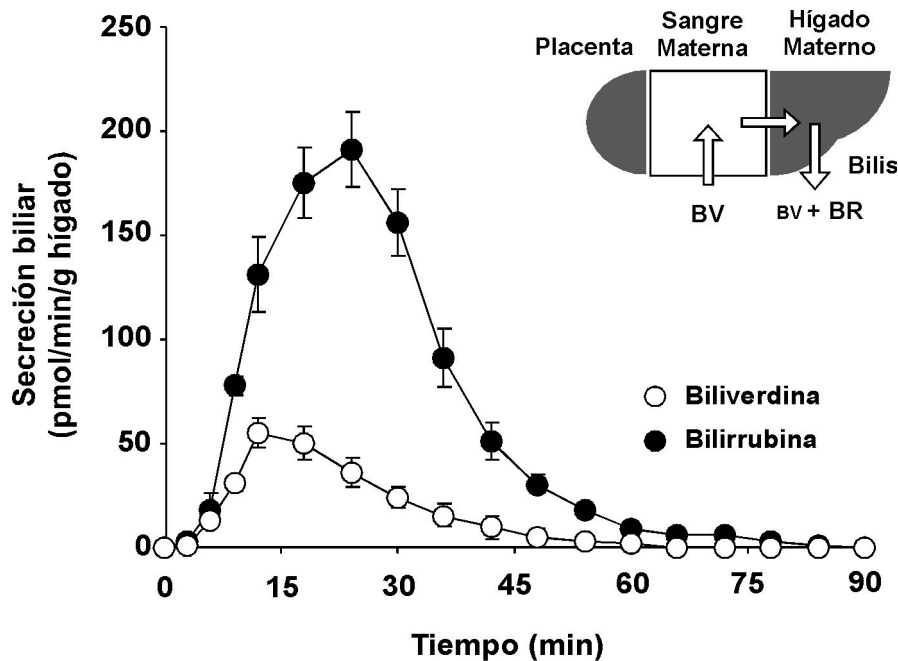


Figura 25. Evolución temporal de la secreción biliar de biliverdina (BV) y bilirrubina (BR) tras la administración de un bolo de 0,1 μmol de BV durante 5 min a través de la vena yugular de ratas gestantes a término ($n=5$). Los valores representados son medias \pm EEM. En la parte superior está inserto un esquema representativo del modelo experimental.

El carácter hidrófilo de la molécula de BV impide que pueda difundir libremente por las membranas placentarias por lo que, a la vista de nuestros resultados, debería existir un mecanismo de transporte en la placenta que captara la BV producida por el feto. De acuerdo con esta hipótesis, se ha visto que la BV es capaz de inhibir el tráfico de BR a través de la placenta (Briz et al., 2003a), por lo que podría utilizar los mismos mecanismos de transporte para ser captada desde la sangre fetal.

Por estas razones, nos planteamos a continuación, determinar cuáles de los transportadores hepáticos de aniones orgánicos colefílicos, con capacidad para transportar pigmentos biliares, podrían estar implicados en esta función en la placenta.

4.2.2. Mecanismos de captación de biliverdina por la placenta de rata

El mecanismo por el que la placenta capta los pigmentos biliares no está aún completamente esclarecido. En el hígado adulto, la BR no conjugada es captada eficazmente por las proteínas OATP1B1 y OATP1B3 (Briz et al., 2003b; Cui et al., 2001). Como hemos visto en el apartado anterior, ambos transportadores están

expresados en la placenta humana a término y se localizan mayoritariamente en el estroma de las vellosidades coriónicas, posiblemente en el endotelio capilar, lo que sugiere que estos transportadores, y en especial OATP1B3 dada su mayor expresión en el trofoblasto, serían buenos candidatos para captar los metabolitos del grupo hemo producidos por el feto.

El modelo experimental elegido para el estudio fue el sistema de expresión heteróloga de proteínas transportadoras de membrana en oocitos de rana *Xenopus laevis*, que ha sido utilizado para expresar proteínas que median la captación celular de diversos compuestos, como ácidos biliares (Briz et al., 2002; Hagenbuch y Meier, 1994; Jacquemin et al., 1994) y pigmentos biliares (Briz et al., 2003b), entre otras moléculas.

Este modelo permite estudiar la especificidad de sustrato del transportador cuyo ARNm se inyecta en el oocito. Una de las ventajas que presenta es que permite medir la cantidad de sustrato captado por un solo oocito que expresa la proteína cuyo ARNm se ha microinyectado. Además, es posible realizar experimentos con un número elevado de estas células reduciendo la dispersión de los valores calculados y aumentando la fiabilidad de los resultados. Por todo ello, esta herramienta ha sido muy utilizada para investigar la funcionalidad de diferentes transportadores (Nakanishi et al., 2003; Schroeder et al., 1998).

La cantidad de BV en los oocitos se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En nuestro caso utilizamos cromatografía de fase reversa acoplada a un detector de ultravioleta/visible de alta sensibilidad. En el apartado de Material y Métodos están descritas las características del equipo de HPLC (apartado 3.1.3) junto con el método cromatográfico y el protocolo de extracción del pigmento de los oocitos de rana *Xenopus laevis* (apartado 3.12.10) usados.

La figura 26 A muestra los cromatogramas representativos de la BV y del la 5-carboxi-rodamina (ROX) obtenidos mediante HPLC al medir la absorbancia a lo largo del tiempo a las longitudes de onda de 378 nm y 567 nm, respectivamente. En la columna cromatográfica se inyectaron 100 µl de una solución que contenía 50 pmol de ROX y 100 pmol de BV. El ROX se utilizó como estándar interno para corregir las pérdidas en el proceso de extracción del pigmento de los oocitos porque, tras el proceso de lisis-extracción, se obtuvo una recuperación superior al 98% (datos no mostrados) y además, no se detectaron interferencias en el registro de su cromatograma con respecto al cromatograma de la BV.

El método cromatográfico utilizado permitía separar bien la BV y el estándar interno del frente del solvente (picos que aparecen en los minutos iniciales, figura 26 A). La BV se observaba como un pico bien definido, sin picos solapados y resuelto en un tiempo de retención de 8 minutos. Para el ROX se observó un pico en el

cromatograma de HPLC a un tiempo de retención de 9 minutos, muy próximo al tiempo de retención de la BV.

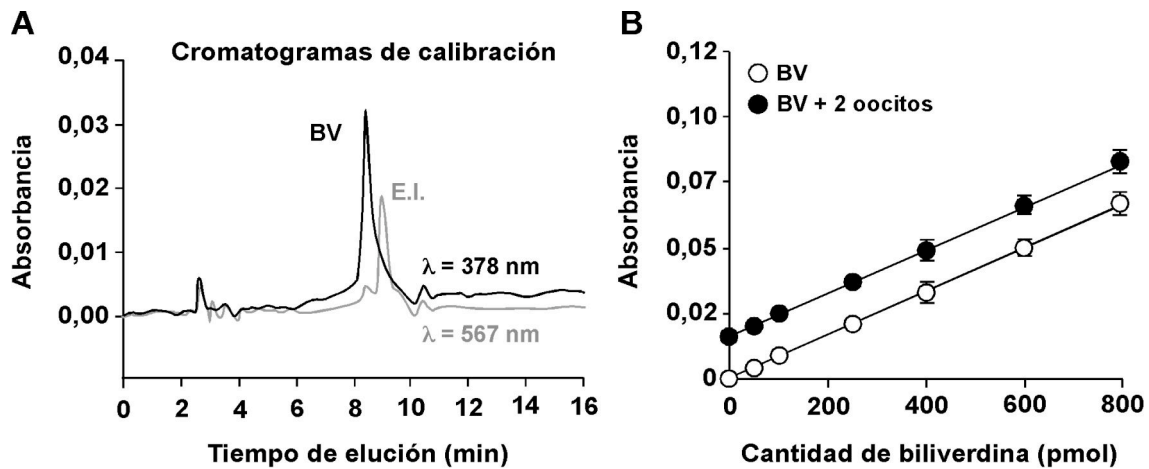


Figura 26. Validación del método para determinar la cantidad de biliverdina (BV) por HPLC en oocitos de *Xenopus laevis*. A: Cromatogramas representativos de HPLC obtenidos al medir la absorbancia a lo largo del tiempo a las longitudes de onda de 378 nm (para la BV) y de 567 nm (para el ROX), tras la inyección de 100 pmol de BV (cromatograma negro) y 50 pmol de 5-carboxi-rodamina (ROX) en 100 μl (E.I., estándar interno, cromatograma gris). B: Recta patrón generada al representar la cantidad de BV frente a la absorbancia. Círculos negros, cantidad de biliverdina inyectada en oocitos de *Xenopus laevis* y determinada por HPLC tras el proceso de lisis-extracción. Círculos blancos, cantidad de biliverdina inyectada en el HPLC sin pasar por el proceso de lisis-extracción. Los valores representados son la media \pm EEM de tres determinaciones por punto.

Para cuantificar el contenido celular del pigmento se realizaron rectas patrón. En la figura 26 B se muestra la recta obtenida al representar la cantidad de BV frente a la absorbancia. El método utilizado nos permitió una detección lineal del pigmento en el rango de concentraciones entre 0 y 800 pmol. Observamos que cuando la BV se inyectaba en oocitos y se extraía posteriormente, todos los valores de la recta eran superiores a los encontrados cuando las mismas cantidades del pigmento se inyectaban directamente en el HPLC. Este resultado nos indica que los oocitos de rana, al igual que los huevos de otras especies (McDonagh, 2001), contienen BV endógena.

A pesar de la presencia endógena de este pigmento en los oocitos de rana, cuando incubamos oocitos inyectados con el ARN total extraído de placenta de rata en un medio captación sin sodio que contenía 100 μM de BV, observamos que existía una clara diferencia entre el contenido de BV de estos oocitos y el contenido endógeno de los oocitos silvestres (figura 27). Que haya una mayor cantidad de BV en los oocitos inyectados con el ARN total de placenta es indicativo de la existencia de un

mecanismo de transporte sodio-independiente responsable de captar la BV del medio extracelular.

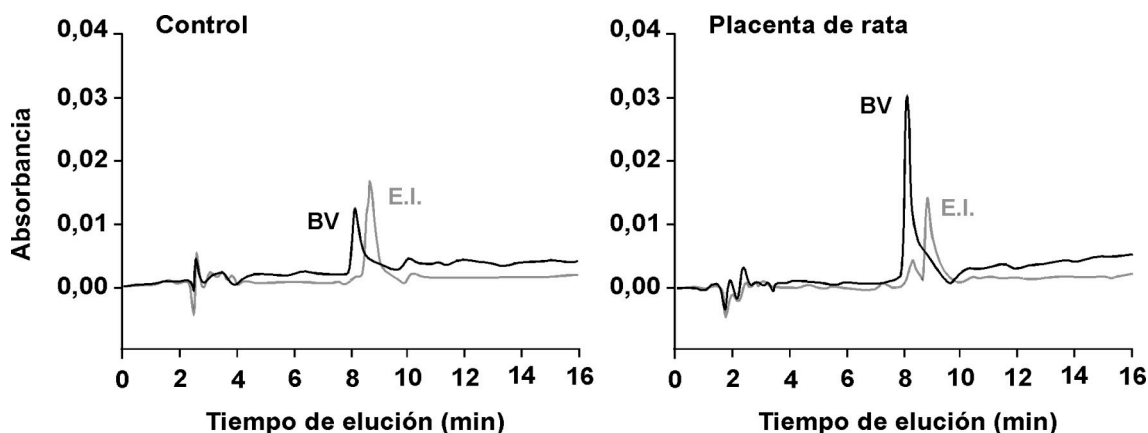


Figura 27. Cromatogramas representativos del contenido de biliverdina (BV) en oocitos de *Xenopus laevis* inyectados con 25 ng del ARN total extraído de placenta de rata a término (Placenta de rata) y en oocitos no inyectados (Control). Dos días después de la inyección, los oocitos se incubaron en medio de captación sin sodio conteniendo 100 μ M de BV durante 1 h a 25°C. El contenido de BV se determinó por HPLC, una vez realizado el proceso de lisis-extracción utilizando 2 oocitos en cada medida.

Como posibles candidatos para transportar BV escogimos las isoformas Oatp1a1, Oatp1a2 y Oatp1b2 ya que son los principales transportadores hepáticos que participan en la captación de aniones orgánicos de forma sodio-independiente (Hagenbuch y Meier, 2004). La expresión funcional de estos transportadores en los oocitos se determinó por su capacidad para transportar ácido taurocólico (TC), un sustrato típico de estas proteínas previamente utilizado para confirmar su funcionalidad en este modelo experimental (Cattori et al., 2001).

En la figura 28, se muestra la captación sodio-independiente de BV y de [³H]-TC en oocitos inyectados con 7 ng del ARNm de Oatp1a1, o de Oatp1a4 ó de Oatp1b2.

Se observa que en nuestras condiciones experimentales las tres isoformas se expresaron funcionalmente en los oocitos, ya que todas captaron [³H]-TC. Los oocitos que expresaban Oatp1a1 transportaron más eficazmente tanto BV como [³H]-TC que los oocitos que expresaban Oatp1a4 u Oatp1b2, cuya captación fue significativamente más baja que la detectada en el primer grupo.

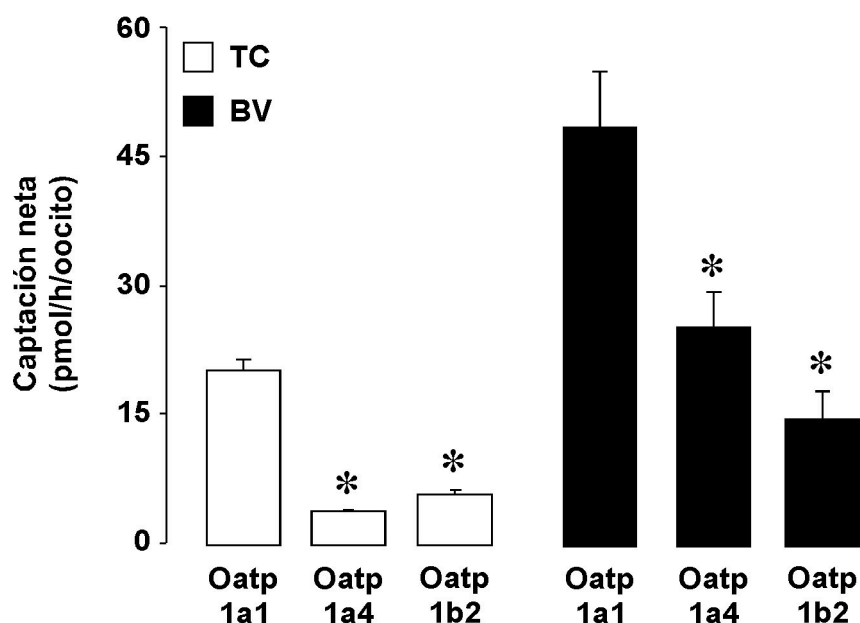


Figura 28. Captación neta de ácido taurocólico ($[^3\text{H}]\text{-TC}$) y de biliverdina-IX α (BV) en oocitos de *Xenopus laevis* que expresan Oatp1a1, Oatp1a4 u Oatp1b2. Los oocitos se inyectaron con 7 ng del ARNm de cada transportador según los grupos y dos días después, se incubaron en medio de captación sin sodio conteniendo 50 μM de $[^3\text{H}]\text{-TC}$ o 100 μM de BV durante 1 h a 25 °C. La captación de BV se determinó por HPLC, una vez realizado el proceso de lisis-extracción utilizando 2 oocitos en cada medida. Los valores representados son las medias \pm EEM de 15 determinaciones. *, $p < 0,05$ en comparación con la captación de los oocitos que expresaban Oatp1a1 por el método de Bonferroni para valores múltiples.

Estos resultados demuestran que las tres isoformas comparten la BV como sustrato. Sin embargo, en el caso de la BR no conjugada se ha descrito que sólo es sustrato de Oatp1a1 (Cattori et al., 2001; Reichel et al., 1999).

En la figura 29 se muestra el efecto del 17 β -glucurónido de estradiol (17 β GE) sobre la captación sodio-independiente de $[^3\text{H}]\text{-TC}$ y BV mediada por oocitos inyectados con 25 ng del ARN total extraído de hígado o de placenta de rata.

Se observa que la expresión de transportadores hepáticos o placentarios en los oocitos produce un aumento de la captación de $[^3\text{H}]\text{-TC}$. En ambos casos, esta captación se redujo significativamente por la presencia en el medio de captación de 17 β GE (100 μM). Este esteroide es un sustrato común de varias isoformas de OATPs/Oatps (Hagenbuch y Meier, 2004). Además, el ARN total de placenta indujo una mayor captación de BV que el de hígado. De un modo similar, el 17 β GE también disminuyó significativamente la captación de este pigmento biliar en los dos grupos de oocitos inyectados.

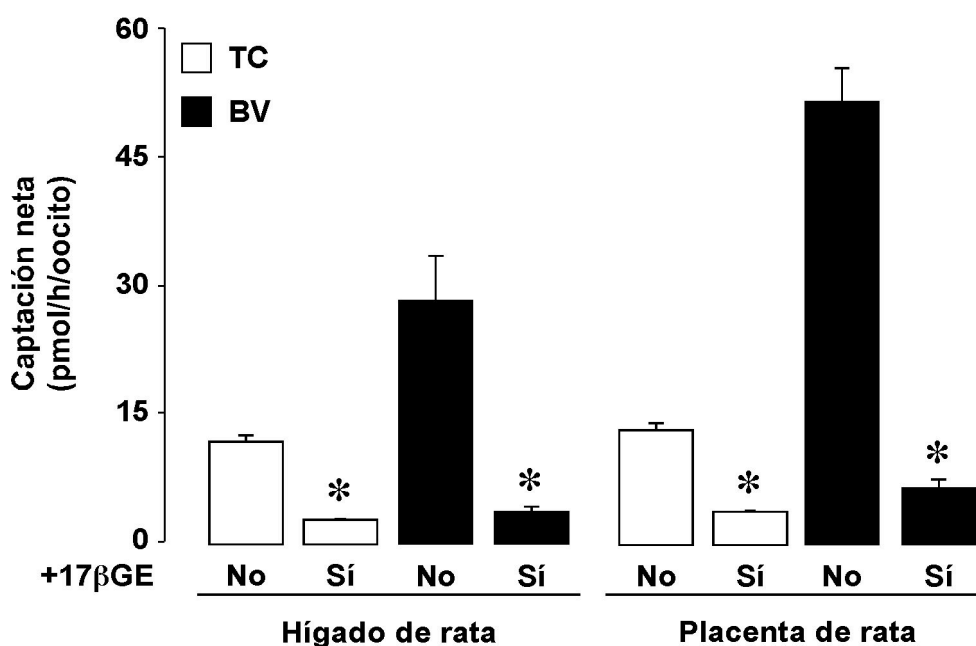


Figura 29. Captación neta de ácido taurocólico ($[^3\text{H}]\text{-TC}$) y de biliverdina-IX α (BV) en oocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el ARN extraído de placenta o hígado de rata. Los oocitos se incubaron en medio de captación sin sodio conteniendo 50 μM de $[^3\text{H}]\text{-TC}$ ó 100 μM de BV en presencia o en ausencia de 100 μM de 17 β -glucurónido de estradiol (17 β GE) durante 1 h a 25°C. La captación de BV se determinó por HPLC, una vez realizado el proceso de lisis-extracción utilizando 2 oocitos en cada medida. Los valores representados son las medias \pm EEM de 15 determinaciones. *, $p < 0,05$ al comparar la captación en ausencia del 17 β GE con la encontrada en presencia de este esteroide por el método de t-test para valores apareados.

A la hora de interpretar estos resultados hay que tener en cuenta que, como los oocitos se inyectaron con el ARN total de tejidos que poseen bombas exportadoras, la captación que observamos, es decir, el contenido celular que detectamos puede ser el resultado de un balance entre la carga y el eflujo mediado por los transportadores que se están expresando en estos tejidos.

Por otra parte, cuando se inyectó el ARN total del hígado o de la placenta en los oocitos, la captación sodio-independiente de BV en estas células fue más elevada que la de TC. Este hecho coincide con que en los hepatocitos la captación de ácidos biliares esté principalmente mediada por el transportador sinusoidal Ntcp que es dependiente de sodio (Hagenbuch et al., 1991). Otra posible explicación podría ser que la expresión de bombas exportadoras podrían reducir de forma diferente el contenido neto de TC o de BV durante la hora de incubación con los compuestos.

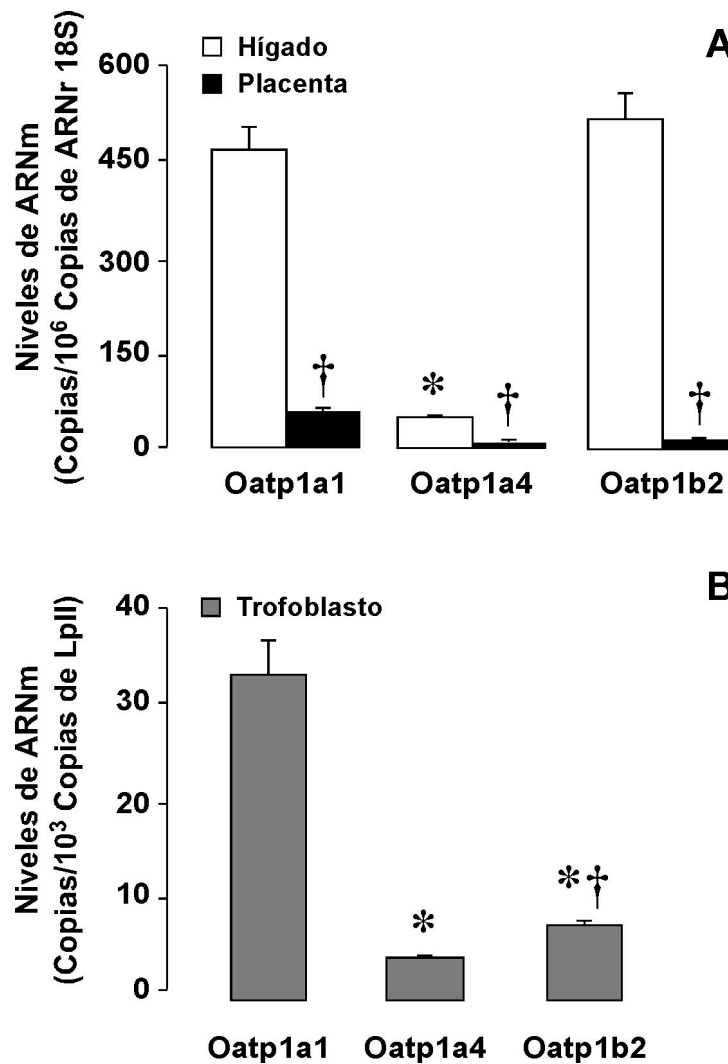


Figura 30. Cuantificación absoluta de la expresión del ARNm de los genes que codifican para las proteínas Oatp1a1, Oatp1a4 y Oatp1b2 en hígado, placenta (A) y trofoblasto (B) de ratas gestantes en el día 21 de la gestación. Los valores, normalizados por el contenido de ARNr 18S, están expresados como número de copias del gen de interés por cada 10⁶ copias del ARNr 18S determinado en cada muestra. La RT-PCR cuantitativa se realizó por triplicado a partir de 10 muestras diferentes de cada tejido. Para la determinación en el trofoblasto, la abundancia del ARNm de cada transportador se corrigió por el contenido del lactógeno placentario de rata tipo II (LpII) que se usó como marcador específico de trofocitos. Los valores representados son las medias \pm EEM. *, $p < 0,05$ al comparar la expresión de los tres transportadores en el mismo tejido por el test de Bonferroni para valores múltiples. †, $p < 0,05$ al comparar el hígado y la placenta por el t-test para valores apareados

Una vez determinada la capacidad de estas proteínas para captar BV decidimos investigar la relevancia de estos transportadores en la placenta de rata. Para ello se determinaron sus niveles de expresión en este órgano por RT-PCR cuantitativa a tiempo real y se utilizó el hígado adulto como referencia. En la tabla 2 del apartado 3.6.3 de Material y Métodos se muestran las secuencias de los oligonucleótidos

utilizados como cebadores en las reacciones de PCR. También aparece el tamaño teórico, en pares de bases (pb), del amplicón que se espera amplificar en cada caso y el número de acceso de cada secuencia en la base de datos GenBank.

En la figura 30 A, se observa que en todos los casos, los niveles de expresión fueron marcadamente más bajos en la placenta que en el hígado materno. Además, la isoforma más abundante en la placenta fue Oatp1a1. Estos bajos niveles de expresión de los Oatps en la placenta a término respecto al hígado materno también han sido descritos recientemente en una colaboración entre nuestro grupo de investigación y el equipo del Dr. Meier (St-Pierre et al., 2004).

Cuando estos valores se corrigieron por la abundancia del ARNm del láctogeno placentario de rata tipo II (LpII), utilizado como marcador de trofocitos, la abundancia del ARNm de Oatp1a1 en el trofoblasto fue 8 veces más alta que la encontrada para las isoformas Oatp1a4 y Oatp1b2 (figura 30 B).

Aunque en su conjunto estos resultados no descartan la participación de otros transportadores en la captación de BV desde la sangre fetal o la sangre materna por la placenta o el hígado, respectivamente, sí que proporcionan evidencias de que varias de las isoformas de Oatps presentes en estos órganos podrían participar en dicha función.

En la placenta, teniendo en cuenta los niveles de expresión de las tres isoformas de Oatps analizadas así como también su capacidad para captar BV, el candidato más relevante para llevar a cabo el transporte de este sustrato sería Oatp1a1. Mientras que en el hígado adulto, tanto Oatp1a1 como Oatp1b2 y en menor medida Oatp1a4, estarían implicados en el captación sinusoidal de BV.

4.2.3. Cuantificación de los niveles de expresión de la enzima Bvr α en el eje hígado materno-placenta-hígado fetal

De los experimentos *in vivo* se deducía que la transferencia de la BV fetal hacia la sangre materna sin previa reducción era muy escasa. Para estudiar la potencial contribución del eje hígado fetal-placenta-hígado materno en la biotransformación de la BV fetal en BR, se determinó la abundancia de la enzima responsable de esta reducción, la Bvr α , en estos tejidos por PCR cuantitativa a tiempo real y Western blot.

En la figura 31 se muestra la abundancia relativa del ARNm de la enzima Bvr α en el hígado fetal, la placenta y el hígado materno de ratas a término. Como se observa, la mayor abundancia de su ARNm se encontró, en el hígado fetal (271%), seguido por el hígado materno (114%) y finalmente por la placenta (102%).

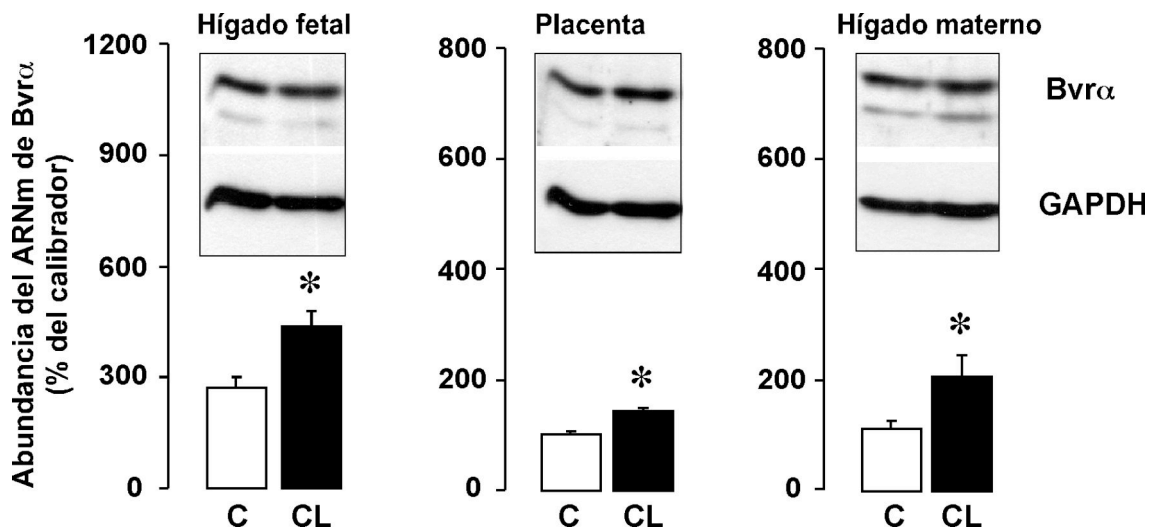


Figura 31. Abundancia relativa del ARNm del gen que codifica para la enzima biliverdina reductasa IX α (Bvr α) en hígado fetal, placenta e hígado materno de ratas gestantes a término. En algunos animales en el día 14, se indujo una colestasis obstructiva (grupo CL) y se simuló la misma operación en las ratas control (grupo C). Los valores se expresan como porcentaje respecto al calibrador (riñón de rata) y son las medias \pm EEM de al menos 6 madres y 12 fetos. *, $p < 0,05$ en comparación con el grupo CL. Los insertos muestran análisis por Western blot representativos de la expresión de Bvr α en homogenados de los tres tejidos de los mismos grupos experimentales. La GAPDH se utilizó como normalizador de carga de las proteínas en cada calle.

Para investigar el efecto de la obstrucción de la excreción biliar materna sobre la expresión de la Bvr α en el eje hígado fetal-placenta-hígado materno, se indujo una colestasis obstructiva en rata gestantes en la última semana de gestación (ver apartado 3.3.1. de Material y Métodos).

En la figura 31, observamos que la colestasis materna (grupo CL) produjo un incremento estadísticamente significativo de la expresión del ARNm del gen de la Bvr α en estos tejidos respecto a la expresión que encontramos en los tejidos de las ratas gestantes controles (grupo C).

Estos cambios en los niveles del ARNm se reflejaron a nivel de proteína, como se observa en el análisis por Western blot de homogenados hepáticos y placentarios obtenidos de ratas control y ratas con colestasis materna (inserto, figura 31). Se utilizó la GAPDH como normalizador de la carga de proteínas.

Se observa que la Bvr α migró como dos bandas con pesos moleculares de 33 y 30 kDa. La aparición de varias bandas ya ha sido observada en estudios previos, y se debe a la modificación post-traducciona que experimenta dicha proteína, dando lugar a la generación de variantes con diferente peso molecular y carga (Huang et al., 1989).

Estos resultados confirman la expresión de la Bvr α en la placenta de rata, cuya actividad enzimática había sido descrita con anterioridad (McDonagh et al., 1981).

La mayor expresión de Bvr α en el hígado fetal que en la placenta sugiere que una gran parte de la BV producida por el feto podría ser transformada en BR en el hígado fetal antes de ser captada por la placenta. Por otra parte, la mayor abundancia de esta enzima en el hígado fetal respecto al materno, coincide con que haya una mayor producción de BR en el feto debido, como hemos comentado anteriormente, al mayor catabolismo del grupo hemo debido principalmente a la menor vida media de sus eritrocitos (90 días frente a 120 días en los adultos). Este hecho, junto con la baja actividad conjugante de la enzima UDPG-transferasa del hígado fetal (Kawade y Onishi, 1981), determina que exista un gradiente de concentración de BR no conjugada en dirección feto a madre (Knudsen y Lebech, 1989; Monte et al., 1995).

Uno de los resultados más interesantes de esta parte del trabajo es el hecho de que haya un aumento de expresión de la Bvr α en todos los tejidos del eje hígado fetal-placenta-hígado materno en ratas gestantes con colestasis obstructiva. Esto probablemente aumente la capacidad de estos órganos para generar BR a partir de BV como parte del *ciclo redox*. Está descrito que la BR es un importante mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo (Baranano et al., 2002), como el causado por la colestasis materna (Perez et al., 2005; Perez et al., 2006). Estos resultados coinciden con los recientemente publicados en nuestro grupo de investigación y que sugieren que la Bvr α en el eje hígado fetal-placenta-hígado materno, podría formar parte de los mecanismos fisiológicos de defensa antioxidante frente al estrés oxidativo generado por la colestasis materna en estos órganos (Perez et al., 2007; Perez et al., 2008).

En resumen, estos resultados sugieren que entre los transportadores involucrados en la captación fetal de BV por la placenta de rata, se encuentran los Oatps y en especial, Oatp1a1. Una vez en la placenta, y antes de transferirse a la madre, la BV es reducida a BR por la Bvr α que está expresada en este órgano. Sin embargo, puede ocurrir que una pequeña cantidad de BV se escape de esta reducción y sea transferida a la sangre materna, por un mecanismo aún desconocido, desde donde es eficazmente captada por el hígado materno probablemente a través de Oatp1a1, Oatp1b2 y Oatp1a4. Una vez en el interior de los hepatocitos, la BV fetal es biotransformada a BR, conjugada y secretada a bilis.

4.3. EFECTO DE MODULADORES DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ABC EN CÉLULAS DE PLACENTA *IN VITRO*

Como hemos descrito en los apartados anteriores, la placenta presenta niveles elevados de varias proteínas ABC, destacando MRP1, MRP4 y BCRP, con niveles de ARNm más altos que en el tejido hepático. Como se ha sugerido, estas bombas exportadoras podrían desempeñar un papel importante en la función de protección de la barrera placentaria.

Como siguiente objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral nos planteamos determinar el efecto de distintos moduladores de la expresión proteica sobre los niveles de estas proteínas ABC en las líneas celulares derivadas de coriocarcinoma humano BeWo, JAr y Jeg-3.

Para ello elegimos tres compuestos: el butirato, un inductor típico de la síntesis de *novο* de proteínas, ampliamente utilizado en cultivos celulares; el ácido quenodesoxicólico (QDC), un ácido biliar abundante en el pool de ácidos biliares en humanos, que es un potente ligando natural del receptor nuclear para ácidos biliares FXR (Lew et al., 2004; Makishima et al., 1999); y el acetaminofeno o paracetamol (APAP) que es un fármaco antiinflamatorio muy utilizado, pero que a dosis elevadas puede ser hepatotóxico y cuyo efecto sobre la placenta no se conoce con exactitud.

La células de coriocarcinoma humano se incubaron con estos compuestos durante el tiempo que estudios preliminares mostraron que se obtenían mayores cambios (datos no mostrados). Estos tiempos fueron 24 h (butirato), 48 h (APAP) ó 72 h (QDC) y el efecto sobre la expresión de las proteínas ABC se determinó por RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

Tras la exposición a 5 mM de butirato sódico (figura 33), se observó un claro efecto inductor de los niveles de ARNm de MRP4 en las tres líneas celulares respecto a los niveles determinados en estas mismas células sin tratar (grupo control), que fue estadísticamente significativo, siendo especialmente elevado en las células BeWo donde su valor se cuadruplicó respecto al grupo control.

Por el contrario, el tratamiento con este ácido graso de cadena corta produjo una fuerte disminución de los niveles de ARNm de BCRP en todas las células, que fue estadísticamente significativa, encontrándose una reducción del 50% en células BeWo y Jeg-3 y del 80% en células JAr, respecto de los valores detectados en las células no tratadas. También se detectó una disminución estadísticamente significativa de la cantidad de transcritos de MRP1 en las células JAr y Jeg-3, aunque fue menos acusada que en el caso de BCRP.

En estudios previos realizados en células derivadas de carcinoma de colon Caco-2 (Cummins et al., 2001) no se habían observado cambios en los niveles de expresión

de MRP1 tras el tratamiento con butirato, lo que sugiere que existen mecanismos diferentes de regulación de la expresión de esta proteína en colon y placenta.

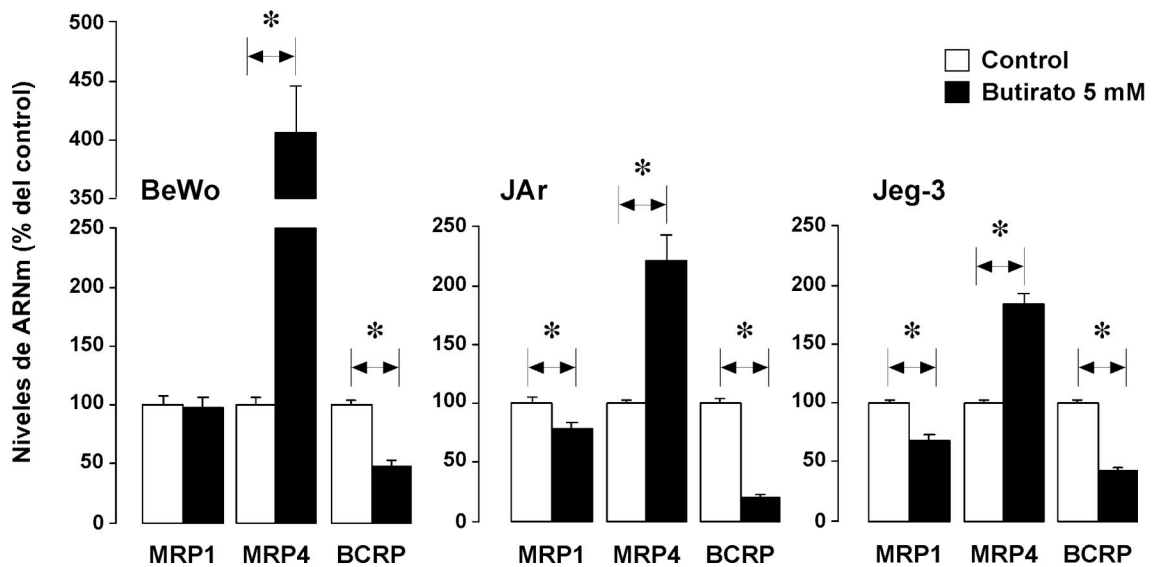


Figura 33. Efecto del butirato sobre la expresión de MRP1, MRP4 y BCRP en células BeWo, JAr y Jeg-3, derivadas de coriocarcinoma humano. Las células se cultivaban en presencia de 5 mM de butirato durante 24 h. Los resultados, normalizados por el contenido de ARNr 18S determinado en cada muestra, están expresados como porcentaje respecto a los niveles encontrados en las células sin tratar (control). La RT-PCR cuantitativa se realizó por triplicado en cada muestra. Los valores son las medias \pm EEM de tres cultivos diferentes realizados por triplicado. * $p < 0,05$, comparando las células tratadas con sus correspondientes controles por el *t*-test para valores apareados.

El efecto contrario del butirato que observamos sobre la transcripción de estos genes podría explicarse en base a estudios previos en los que se ha comprobado que los genes que responden a la modulación por butirato presentan en sus regiones promotoras elementos de respuesta para este ácido graso que pueden ser inductores o represores (Davie, 2003). De este modo, nuestros resultados sugieren que BCRP podría tener un elemento de respuesta represor en su región promotora, mientras que MRP4 tendría un elemento inductor.

En situaciones de colestasis se produce una alteración de la secreción biliar con retención de diversas sustancias colefilicas en la sangre entre las que destacan los ácidos biliares y la bilirrubina. Estudios recientes llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, en ratas con colestasis obstructiva durante la tercera y última semana de gestación, han revelado que la acumulación de ácidos biliares en el compartimento materno y fetal puede producir estrés oxidativo y daño en la placenta (Perez et al., 2005) y estimular la expresión de proteínas relacionadas con la defensa antioxidante, como las proteínas que transportan ácido ascórbico SVCTs (Perez et al., 2008). Por

otra parte, se ha demostrado que los ácidos biliares pueden regular la expresión de bombas ABC mediante su unión a receptores nucleares (Zollner et al., 2006).

Uno de los ácidos biliares que está muy elevado en el suero de pacientes con colestasis intrahepática gestacional es el QDC (Pascual et al., 2002; Serrano et al., 1998), el ligando natural del receptor nuclear FXR. Por estas razones elegimos este ácido biliar.

La concentración de 50 μM que utilizamos se seleccionó porque es del orden de la concentración de ácidos biliares que se encuentran en sangre en situaciones de colestasis moderada o en los periodos post-pandriales. Además, esta concentración es lo suficientemente baja como para asegurarnos de que no se producirían los efectos tóxicos que se han descrito a concentraciones superiores a 200 μM aproximadamente (Martínez-Díez et al., 2001). De hecho, la presencia de los ácidos biliares no causó cambios en la viabilidad del cultivo (datos no mostrados) y está bastante por debajo de la concentración micelar crítica de la mayoría de las especies moleculares de ácidos biliares.

En base a estudios previos, las células se expusieron durante 72 h a QDC. Como se observa en la figura 34, sólo MRP4 respondió a este ácido biliar, encontrándose un ligero incremento de sus niveles de expresión en las células BeWo, que no llegó a ser estadísticamente significativo, y una elevación de aproximadamente un 50% de la cantidad de transcritos encontrada en las células Jeg-3 tratadas en comparación con las células control. Sin embargo, no se observaron cambios en MRP1 y BCRP.

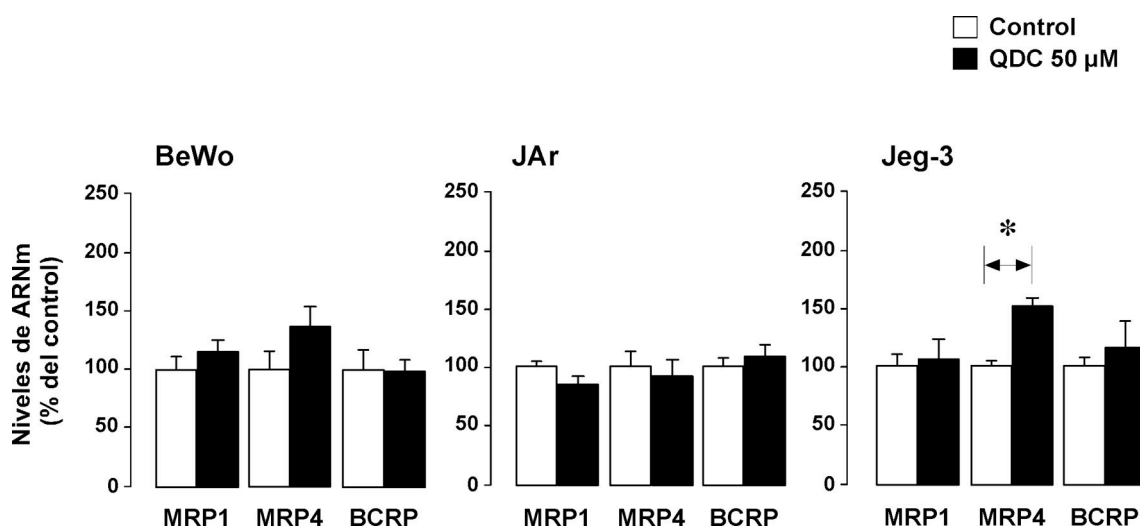


Figura 34. Efecto del ácido quenodesoxicólico (QDC) sobre la expresión de MRP1, MRP4 y BCRP en células BeWo, JAr y Jeg-3, derivadas de coriocarcinoma humano. Las células se cultivaban en presencia de 50 μM de QDC durante 72 h. Los resultados, normalizados por el contenido de ARNr 18S determinado en cada muestra, están expresados como porcentaje respecto a los niveles encontrados en las células sin tratar (control). La RT-PCR cuantitativa se

realizó por triplicado en cada muestra. Los valores son las medias \pm EEM de tres cultivos diferentes realizados por triplicado. * $p < 0,05$, comparando las células tratadas con sus controles por el *t*-test para valores apareados.

En estudios previos realizados en ratas gestantes con colestasis obstructiva se observó que la colestasis materna producía un incremento en los niveles de ARNm de Mrp1 en la placenta (Serrano et al., 2003). La acumulación de otros ácidos biliares, bilirrubina o citoquinas o el tiempo de exposición de la placenta a las sustancias colestásicas podrían explicar estos resultados, y tampoco se puede descartar que existan diferencias entre especies.

Por último analizamos la respuesta de estas bombas ABC al APAP, un fármaco común prescrito como analgésico y antipirético. Se considera un fármaco seguro cuando se administra a dosis terapéuticas (hasta 4 g/día), sin embargo la ingestión accidental o intencionada de grandes cantidades del mismo produce hepatotoxicidad (Lee, 2004) mediada por su metabolito tóxico N-acetil-p-benzoquinona imina que depleciona las reservas de glutatión reducido (GSH), produce estrés oxidativo y se une a macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN (Mitchell et al., 1973). Se ha descrito que el tratamiento con dosis subtóxicas de APAP produce una resistencia a la hepatotoxicidad producida por el fármaco posiblemente asociada a la inducción de proteínas ABC (Aleksunes et al., 2008a; Dalhoff et al., 2001; Shayiq et al., 1999).

En este punto, decidimos determinar el efecto de dosis subtóxicas de APAP sobre la expresión de MRP1, MRP4 y BCRP en las células BeWo, JAr y Jeg-3. Para ello, primero realizamos un ensayo dosis-respuesta para determinar las concentraciones no tóxicas, subtóxicas y tóxicas del APAP sobre estas células.

En la figura 35 se muestran las curvas de viabilidad celular en presencia de un amplio rango de concentraciones de APAP (desde 20 μ M a 40.000 μ M) determinadas por el test de rojo neutro para BeWo, debido a la menor adhesividad a la placa, o mediante el test de formazán para JAr y Jeg-3, a las 48 h del tratamiento.

Se definió la concentración tóxica o IC₅₀ como la concentración a la cual se observó una reducción de un 50% de la viabilidad celular; la concentración subtóxica como la concentración probada justo anterior a la que produjo una reducción de la viabilidad celular; y la concentración no tóxica como la concentración que no produjo ningún cambio en la viabilidad celular. En la tabla 6 (inserta en la figura 35) se recogen las concentraciones no tóxica, subtóxica y tóxica observadas para cada tipo celular.

Se comprobó que el APAP ejerció un efecto más tóxico en las células BeWo y JAr que en las células Jeg-3. En las células Jeg-3 la toxicidad empezó a manifestarse a partir de una concentración de 5 mM (dosis subtóxica para estas células), mientras que en el caso de las células BeWo y JAr, la dosis subtóxica se determinó en una concentración de 1 mM. La toxicidad del APAP fue mayor en las células BeWo para las que se calculó una IC₅₀ de 5 mM, mientras que para las células JAr y Jeg-3 la IC₅₀ fue de 20 mM.

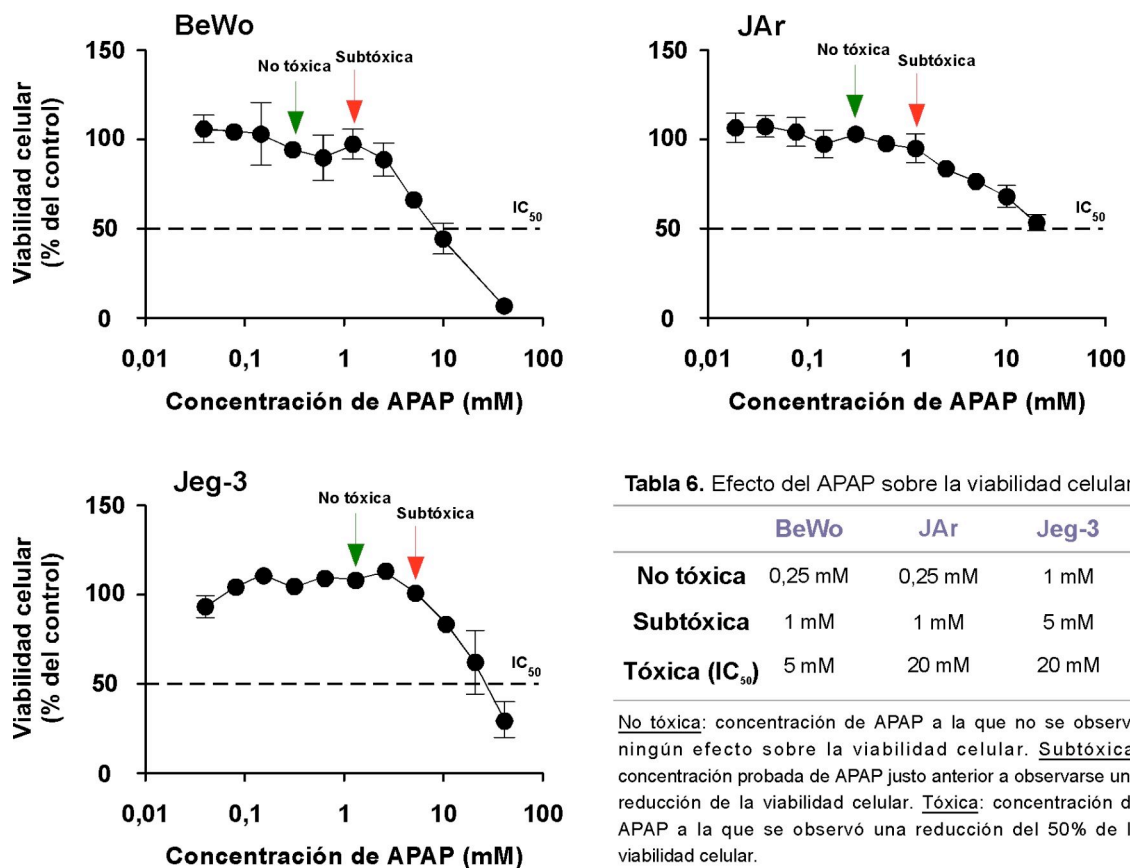


Figura 35. Efecto del acetaminofeno (APAP) sobre la viabilidad celular de las líneas celulares derivadas de coriocarcinoma humano determinada mediante el test del rojo neutro (BeWo) o el test de formazán (JAr y Jeg-3). Las células se cultivaron durante 48 h en presencia de 0, 20, 40, 80, 150, 300, 625, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000 y 40000 μ M de APAP. Los resultados, expresados como porcentaje respecto a los valores encontrados en las células no tratadas o control (100%), representan la media \pm EEM de dos cultivos diferentes realizados por triplicado. La tabla 6 inserta en la figura recoge los valores de las concentraciones no tóxicas, subtóxicas y tóxicas para cada línea celular.

Una vez determinada la concentración subtóxica de APAP para cada tipo celular se analizaron los niveles de ARNm de MRP1, MRP4 y BCRP en estas células tras el tratamiento con esta concentración durante 48 h.

En la figura 36 se observa un aumento estadísticamente significativo de la cantidad de transcritos de MRP4 (células BeWo y JAr) y de MRP1 (células BeWo) respecto a sus controles. Sin embargo no se detectó el mismo perfil de expresión en las células Jeg-3 donde encontramos una reducción de la expresión de BCRP de casi un 50% de los valores encontrados en las células control.

El perfil de inducción por APAP encontrado en las células BeWo y JAr, pero no en Jeg-3, coincide con el perfil de expresión que se ha descrito a nivel hepático donde se

ha determinado que dosis tóxicas de APAP producen un aumento de varias isoformas de Mrps (entre ellas Mrp1 y Mrp4) y sin embargo, no modifican la expresión de BCRP (Aleksunes et al., 2006; Aleksunes et al., 2008b).

Además, nuestros resultados apoyan estudios recientes donde se ha descrito que el tratamiento con dosis subtóxicas de APAP produce una sobreexpresión de algunas isoformas de Mrps, principalmente Mrp3 y Mrp4, y que como consecuencia se desarrolla una resistencia a la hepatotoxicidad producida por este fármaco (Aleksunes et al., 2008a; Ghanem et al., 2009). Por otra parte, en este trabajo hemos visto que también podría participar Mrp1 en este fenómeno de resistencia ya que, en nuestras condiciones experimentales, observamos un incremento de su expresión en las células BeWo.

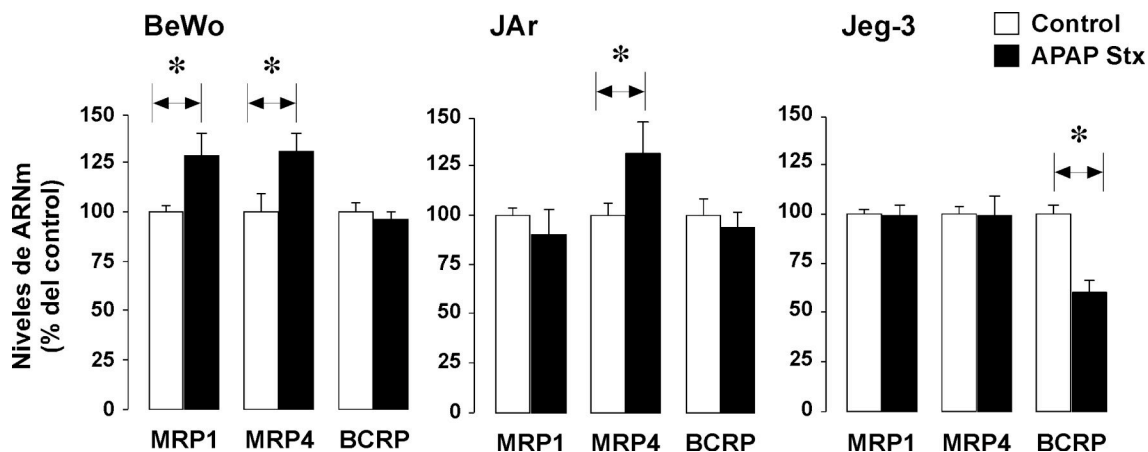


Figura 36. Efecto de concentraciones subtóxicas de acetaminofeno (APAP) sobre la expresión del ARNm de MRP1, MRP4 y BCRP en células BeWo, JAr y Jeg-3, derivadas de coriocarcinoma humano. Las células se cultivaron en presencia de 1 mM (JAr y BeWo) ó 5 mM (Jeg-3) de APAP durante 48 h (APAP Stx). Los resultados, normalizados por el contenido de ARNr 18S determinado en cada muestra, están expresados como porcentaje respecto a los niveles encontrados en las células sin tratar (control). La RT-PCR cuantitativa se realizó por triplicado en cada muestra. Los valores son las medias \pm EEM de tres cultivos diferentes realizados por triplicado. * $p < 0,05$, comparando las células tratadas (APAP Stx) con sus controles por el *t*-test para valores apareados. Stx: subtóxico.

En conjunto estos resultados sugieren que estas células responden a la presencia de compuestos potencialmente tóxicos, que pueden producir daño por estrés oxidativo, sobreexpresando principalmente MRP4 como mecanismo de defensa, por lo que esta bomba podría tener un papel clave en la función de defensa de la placenta, además de su posible participación en el transporte de ácidos biliares del feto a la madre (Rius et al., 2006; Rius et al., 2003).

4.4. PAPEL DE BCRP EN EL TRANSPORTE DE ÁCIDOS BILIARES

Como hemos mencionado en la introducción, BCRP presenta un amplio espectro de sustratos de diversa naturaleza química (Allikmets et al., 1998; Doyle et al., 1998; Miyake et al., 1999). Entre ellos se encuentran sustancias endógenas y xenobióticos, incluyendo fármacos antitumorales, por lo que es responsable de conferir el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en células tumorales (Krishnamurthy y Schuetz, 2006; Robey et al., 2007). En tejidos sanos, destaca su elevada expresión en la placenta, capilares sanguíneos y en células madre, además de en la membrana apical de hepatocitos y enterocitos (Robey et al., 2009; Vlaming et al., 2009).

Su localización apical en la membrana del sincitiotrofoblasto ha sido descrita en este trabajo de Tesis Doctoral y por otros autores (Litman et al., 2002; Maliepaard et al., 2001; Yeboah et al., 2006). Aunque su papel fisiológico en la placenta es aún incierto, se cree que podría desempeñar un importante papel en la protección del feto frente a fármacos y xenobióticos (Mao, 2008). También se ha sugerido que podría regular la síntesis de estrógenos por la placenta (Grube et al., 2007; Imai et al., 2003), e incluso proteger al trofoblasto de la apoptosis inducida por citoquinas o por otros activadores de la vía de señalización de la ceramida (Evseenko et al., 2007a; Evseenko et al., 2007b).

Debido a la inmadurez de la función excretora del hígado fetal, los ácidos biliares que el feto es capaz de sintetizar desde temprana edad, son transferidos hacia la madre a través de la placenta mediante un mecanismo dependiente de ATP mediado posiblemente por proteínas ABC (Bravo et al., 1995; Marin et al., 1995). A diferencia del hígado, donde la BSEP es el principal sistema de excreción de ácidos biliares a bilis, en la placenta esta bomba no parece tener un papel relevante, debido a su baja expresión. Como los niveles de expresión de otras proteínas ABC en la membrana apical del trofoblasto, como MRP2 y MRP4, que podrían estar implicadas en la función de tipo hepatobiliar de la placenta, son bajos, no se puede descartar la participación de otra bomba ABC.

En los últimos años se ha descrito que varios esteroides, incluyendo probablemente algunos ácidos biliares, son transportados por BCRP y que esta bomba presenta una mayor afinidad por sus derivados sulfatados (Janvilisri et al., 2005; Suzuki et al., 2003).

Con estos antecedentes y teniendo en cuenta su localización subcelular en la placenta y en el hígado, donde aún no se conoce con exactitud qué papel fisiológico juega en la secreción biliar de compuestos colefilicos, nos planteamos como siguiente objetivo determinar si los ácidos biliares son sustratos naturales de BCRP.

Para llevar a cabo nuestro estudio decidimos utilizar dos modelos experimentales. En primer lugar, utilizamos la sublínea celular resistente al cisplatino WIF-B9/R, que

sobreexpresa proteínas ABC (Briz et al., 2003) y crece de forma polarizada en cultivo simple sobre placa (Bravo et al., 1998), lo que permite caracterizar el tráfico vectorial de ácidos biliares al canalículo. Y por otro lado, utilizamos el modelo de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de rana *Xenopus laevis* para expresar de forma aislada BCRP y realizar estudios funcionales.

4.4.1. Determinación de la capacidad de BCRP para transportar ácidos biliares utilizando la sublínea celular WIF-B9/R como modelo *in vitro*

Para investigar el tráfico vectorial de ácidos biliares en células intactas es necesario utilizar células polarizadas que además expresen niveles adecuados de los transportadores de estos aniones orgánicos colefílicos presentes en los hepatocitos. Los cultivos primarios de hepatocitos y muchas de las líneas celulares derivadas de hepatoma no combinan ambas características. Por un lado, los hepatocitos en cultivo primario van perdiendo gradualmente su polaridad y el tráfico vectorial de ácidos biliares a medida que aumenta el tiempo de cultivo (Kukongviriyapan y Stacey, 1989). Por otra parte, aunque muchas de las líneas celulares de hepatoma mantienen de forma parcial la expresión de algunos de los transportadores de ácidos biliares (Cantz et al., 2000), normalmente o están muy poco polarizadas o no se polarizan (Van et al., 2004).

Sin embargo, la línea celular híbrida de fibroblastos humanos y hepatoma de rata WIF-B9, después de un tiempo en cultivo, muestra un patrón de polaridad similar al de los hepatocitos *in vivo*, no sólo estructuralmente sino también funcionalmente (Bravo et al., 1998). Estas células forman estructuras equivalentes a los canalículos biliares de los hepatocitos y se ha demostrado que tienen capacidad para transportar derivados de ácidos biliares, como el derivado fluorescente colilglicilamido fluoresceína (CGamF), hacia estas estructuras apicales (Bravo et al., 1998). Además, estas células se han utilizado previamente como modelo *in vitro* para el estudio de la expresión funcional de proteínas ABC localizadas en la membrana canalicular, como la Mrp2 de rata (Nies et al., 1998).

En estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, se desarrolló la línea celular resistente al cisplatino WIF-B9/R que además de mantener las características de la línea silvestre WIF-B9, tiene sobreexpresadas algunas proteínas ABC (Briz et al., 2003).

La capacidad que tienen las células WIF-B9/R para formar estructuras similares a los canalículos biliares se confirmó mediante el análisis de la expresión de un marcador de membrana apical, como es Mrp2, y un marcador de tight-junctions como es la proteína ZO-1, por microscopía de inmunofluorescencia. En la figura 36 se observa como Mrp2, en color verde, está localizada en la membrana apical de estas células,

delimitando estas estructuras similares a canalículos biliares que se forman entre varias células. ZO-1, en color rojo, se sitúa alrededor de estas estructuras, como si fuesen anillos que marcan el límite entre los dominios de la membrana apical y basolateral de estas células.

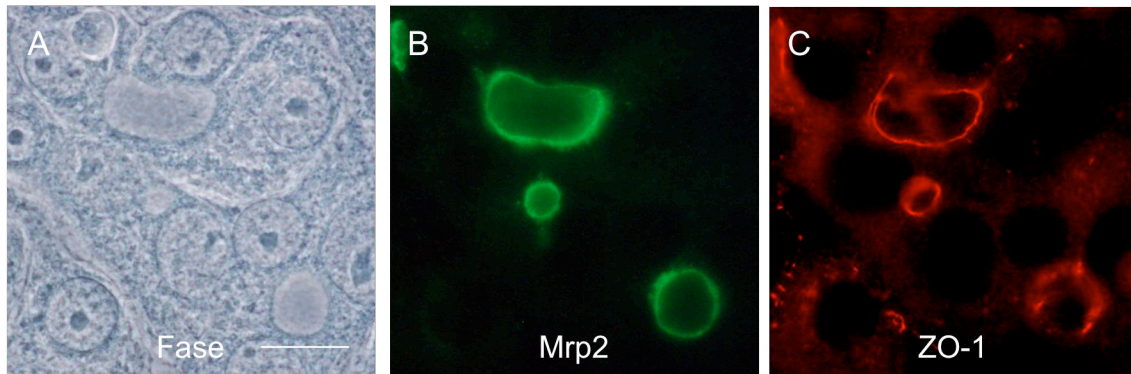


Figura 36. Localización por inmunofluorescencia de las estructuras equivalentes a canalículos biliares en células WIF-B9/R. (B) Se utilizó la bomba Mrp2, en color verde, para marcar la membrana apical de las células. (C) Se utilizó la proteína asociada a tight-junctions ZO-1, en color rojo, como marcador del límite entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de estas células. (A) Imagen de contraste de fase. Barra de escala: 20 µm.

Se sabe que las células WIF-B9/R sobreexpresan, respecto a su línea parental, Mrp1 y Mrp2 y en menor grado, Mdr1, siendo estas proteínas en parte probablemente las responsables de su fenotipo de resistencia (Briz et al., 2003).

Para determinar si entre las proteínas ABC que sobreexpresan estas células se encontraba BCRP y además ampliar el estudio de la expresión de otras bombas transportadoras en estas células y compararlas con la línea parental, se determinó la abundancia del ARNm de las proteínas que se muestran en la tabla 7, tanto de los ortólogos de humanos como de rata, por RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

Los resultados obtenidos mostraron que, de entre los ortólogos de rata, destacaba la expresión de Mdr1, Mrp1, Mrp2 y Mrp3 en las células WIF-B9 respecto a los niveles en hígado de rata. Sin embargo, los valores encontrados para Mdr2 y Bcrp en estas células fueron muy bajos, y únicamente se detectaron trazas de la expresión de Bsep.

Como cabía esperar, se detectó un marcado aumento de la expresión de todas las proteínas ABC de rata, excepto de Bsep, en la sublínea celular WIF-B9/R.

Tabla 7. Cuantificación relativa de los niveles expresión del ARNm de proteínas ABC.

Nivel de expresión (% respecto al hígado)					
Genes humanos	WIF-B9	WIF-B9/R	Genes de rata	WIF-B9	WIF-B9/R
ABCB1	2,5 ± 1,0	3,6 ± 0,5	Abcb1	463 ± 5,0	1160 ± 25 ^a
ABCB4	ND	ND	Abcb4	15,7 ± 0,1	60,2 ± 4,5 ^a
ABCB11	ND	ND	Abcb11	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
ABCC1	ND	ND	Abcc1	230 ± 13	547 ± 96 ^a
ABCC2	0,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1 ^a	Abcc2	159 ± 16	551 ± 18 ^a
ABCC3	ND	ND	Abcc3	282 ± 14	1158 ± 93 ^a
ABCG2	10,8 ± 1,5	70,3 ± 18,9 ^a	Abcg2	2,8 ± 0,6	9,5 ± 0,9 ^a

La RT-PCR cuantitativa se realizó por triplicado en muestras obtenidas de dos cultivos diferentes. Los resultados se normalizaron respecto al contenido de ARNr 18S en cada muestra y están expresados como porcentaje respecto a los niveles de expresión encontrados en el hígado (100%). Los valores se representan como media±EEM. ND, no detectable. ^a, p < 0.05 comparado con WIF-B9 por el t-test para valores apareados.

Sin embargo, ni en células WIF-B9 ni en la sublínea resistente al cisplatino, se detectó la expresión de las isoformas humanas MRP1, MRP3, MDR3 y BSEP, y tan sólo se encontraron niveles muy bajos de MDR1 y MRP2. Por el contrario, BCRP fue la isoforma más abundante en estas células, aunque sus niveles de expresión en las células WIF-B9 fueron solamente del 10,8% respecto a los niveles encontrados en el hígado, mientras que su expresión aumentó más de cinco veces en las células resistentes al cisplatino, llegando a alcanzar valores próximos al 70,3% de la expresión de esta bomba en el hígado.

En la figura 37 A se muestra el análisis por Western blot de la presencia de BCRP en lisados celulares de hepatocitos de rata y humanos y en estas células. Se comprobó que la elevada expresión de BCRP a nivel de su ARNm también se tradujo en una mayor expresión de la proteína, llegando a ser más abundante en las células resistentes que en las células parentales e incluso más que en hígado. Además, por inmunofluorescencia se determinó que se localizaba en la membrana apical de estas células (figura 37 C). La figura 37 B permite visualizar el mismo campo en contraste de fase.

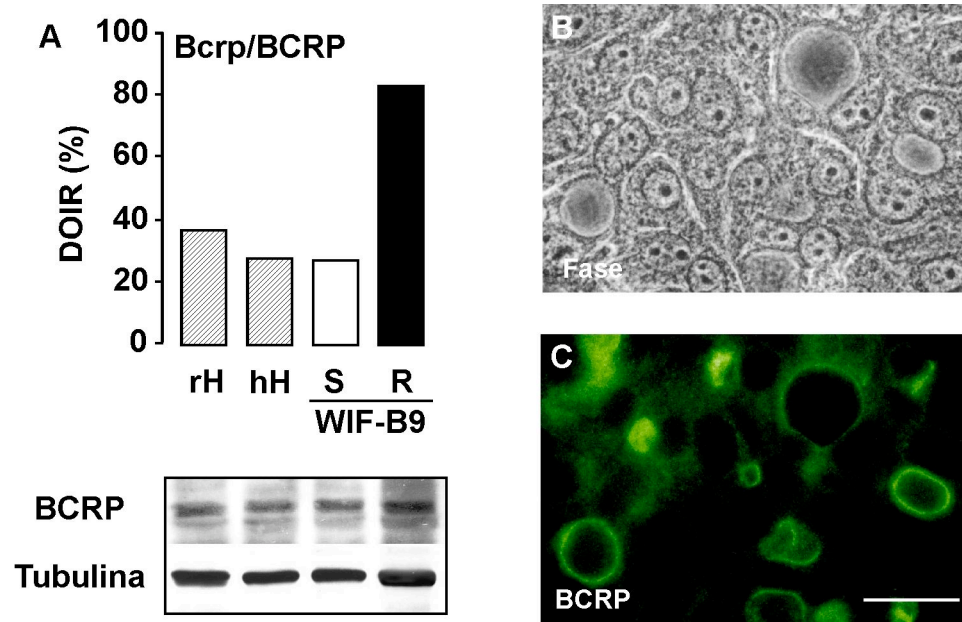


Figura 37. Inmunodetección de BCRP en células WIF-B9/R. (A) Western blot y análisis densitométrico de Bcrp/BCRP en lisados celulares de hepatocitos de rata (rH), hepatocitos humanos (hH) y en células WIF-B9 silvestres (S) y resistentes al cisplatino (R), tamaño de la banda 70 kDa. Los resultados se normalizaron en función del contenido de α -tubulina de las muestras y se expresaron como porcentaje de la densidad óptica integrada relativa (DOIR) de BCRP respecto a la intensidad de la banda detectada para la α -tubulina (100%) en la misma muestra. (B) Imagen de contraste de fase y (C) localización por inmunofluorescencia de BCRP en células WIF-B9/R. Barra de escala; 20 μ m.

La ausencia de expresión de Bsep/BSEP en las células WIF-B9 ha sido descrita recientemente (Wakabayashi et al., 2004). Nuestros resultados confirman este hecho y además demuestran que de entre las proteínas ABC que están sobreexpresadas en las células WIF-B9/R, no se encuentra Bsep/BSEP.

Puesto que las células WIF-B9 son híbridos de células de hepatoma de rata y de fibroblastos humanos, sólo mantienen parte de los cromosomas de sus células parentales (Shanks et al., 1994). Basándonos en nuestros resultados, se podría decir que muchos de los genes estudiados que codifican para proteínas ABC humanas están ausentes, salvo BCRP cuya expresión, y en menor medida, también la de su ortólogo de rata, se detectó claramente en las células WIF-B9 y además se comprobó que se encontraba sobreexpresada en la sublínea celular resistente. Por otra parte, estos resultados confirman que esta bomba presenta una localización subcelular en estas células similar a la encontrada en los hepatocitos *in vivo*, la membrana apical. Puesto que las células WIF-B9 ya han sido utilizadas previamente como modelo de expresión funcional de proteínas ABC como la Mrp2 (Nies et al., 1998), decidimos

utilizar éstas y la sublínea celular WIF-B9/R como un modelo *in vitro* para investigar la capacidad de Bcrp/BCRP para transportar ácidos biliares.

Escogimos el derivado fluorescente del ácido biliar GC, CGamF, para realizar los estudios funcionales, ya que previamente había sido utilizado para caracterizar mecanismos de la secreción biliar (Kitamura et al., 1990; Sherman y Fisher, 1986).

La captación de CGamF por los hepatocitos de rata y su secreción biliar se parece a la del ácido biliar del que deriva, GC, aunque difiere de la ruta de secreción de la fluoresceína (Kitamura et al., 1990).

Sin embargo, el o los transportadores responsables de la secreción biliar de CGamF no se conocen aún con exactitud. Recientemente, se ha comprobado que BSEP transporta CGamF (Mita et al., 2006). Puesto que, como hemos confirmado, esta bomba no está expresada en las células WIF-B9/R, esto nos permitió investigar el papel de otras proteínas ABC canaliculares, como BCRP, en la secreción de CGamF a los canalículos biliares de estas células.

Una vez sintetizado el derivado fluorescente CGamF, se determinó la capacidad de acumulación intracelular de la fluoresceína y del CGamF a lo largo del tiempo mediante la incubación de las células WIF-B9 y WIF-B9/R en presencia de estos compuestos fluorescentes. Las figuras 38 y 39, muestran la evolución temporal de la acumulación intracelular de fluoresceína y de CGamF, respectivamente, en estas células.

Se observa que la acumulación de ambos compuestos en el interior celular fue significativamente inferior en las células WIF-B9/R respecto a las células WIF-B9 durante el periodo de tiempo estudiado.

Para determinar si esta menor acumulación de los sustratos en las células WIF-B9/R era debida a la actividad de las proteínas ABC que se habían detectado sobreexpresadas en esta línea celular, se realizaron estudios de acumulación celular y eflujo de estos sustratos en presencia de distintos inhibidores. Los inhibidores utilizados fueron: verapamilo, conocido inhibidor de MDR1, probenecid que inhibe MRPs, TC que es sustrato de algunas isoformas de MRPs y podría actuar como inhibidor competitivo, y Hoechst-33342 que es sustrato de MDR1 y de BCRP. El tiempo elegido para la determinación de la acumulación de fluoresceína y CGamF fue de 1 h tras la incubación de las células en presencia de uno de los sustratos junto con uno de los inhibidores.

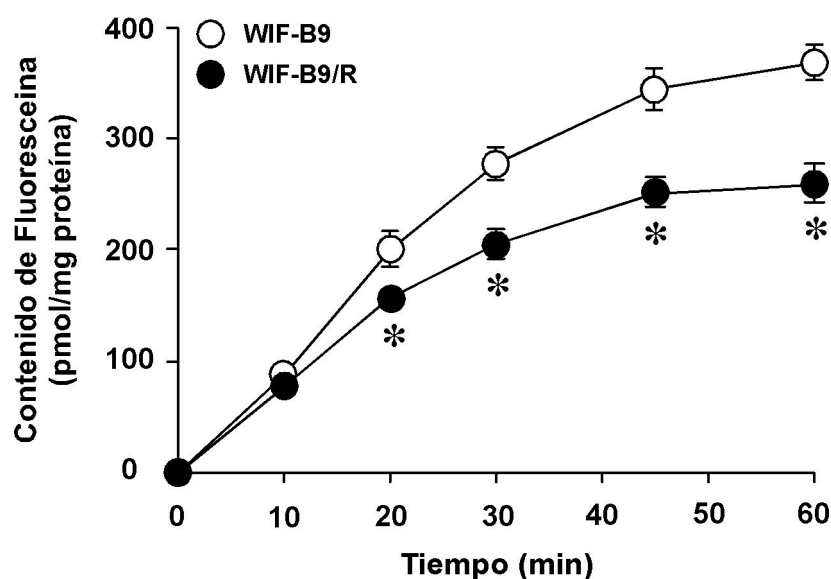


Figura 38. Evolución temporal de la acumulación intracelular de fluoresceína en células WIF-B9 y WIF-B9/R. La cantidad de fluoresceína acumulada se determinó tras incubar las células en presencia de 10 μ M de acetato de fluoresceína a 37°C durante el tiempo indicado. Los valores se representan como medias \pm EEM de los triplicados de tres cultivos diferentes. * $p < 0,05$ comparado con WIF-B9 por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

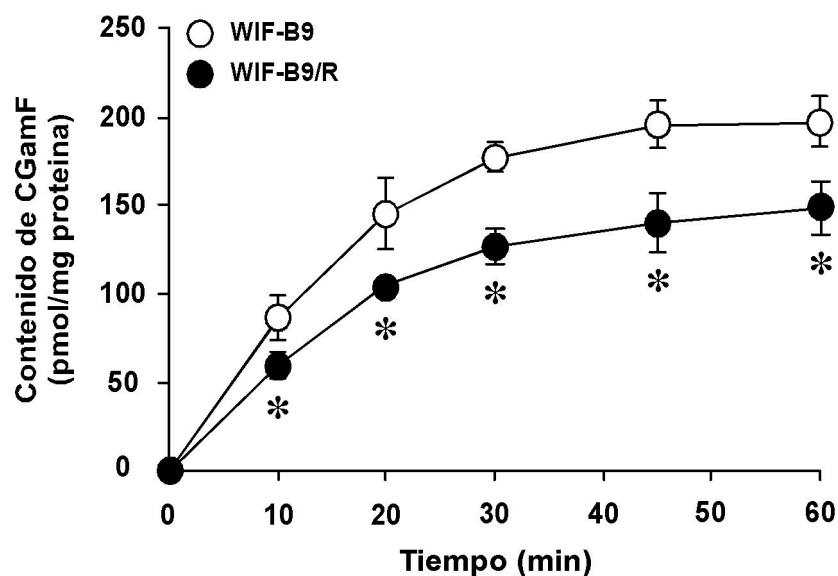


Figura 39. Evolución temporal de la acumulación intracelular de colilglicilamido fluoresceína (CGamF) en células WIF-B9 y WIF-B9/R. La cantidad de CGamF acumulada se determinó tras incubar las células en presencia de 5 μ M de CGamF a 37°C durante el tiempo indicado. Los valores se representan como medias \pm EEM de los triplicados de tres cultivos diferentes. * $p < 0,05$ comparado con WIF-B9 por el test de comparación múltiple de Bonferroni.

En la figura 40 se observa que sólo el probenecid modificó la acumulación de fluoresceína aumentando de forma significativa su contenido tanto en las células parentales como en las células resistentes. Sin embargo, este compuesto no tuvo ningún efecto sobre la acumulación de CGamF en estas células (figura 41).

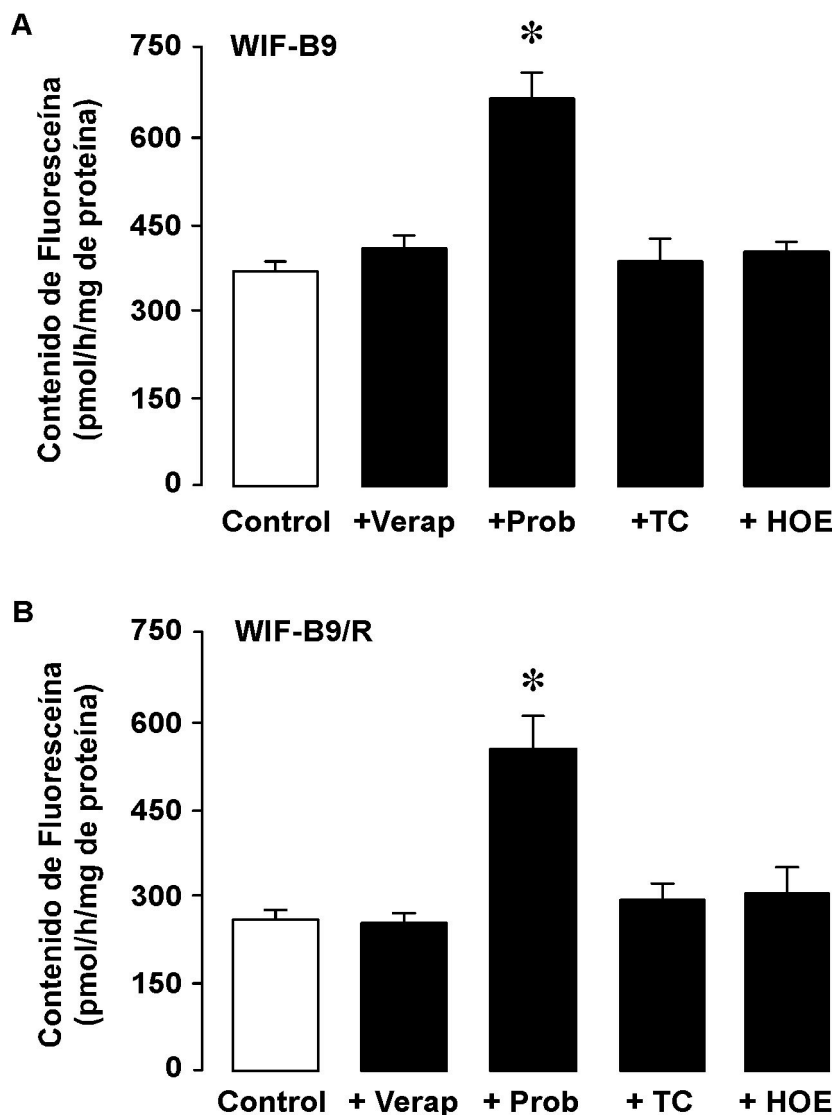


Figura 40. Efecto de diferentes compuestos sobre la acumulación intracelular de fluoresceína en células WIF-B9 (A) y WIF-B9/R (B). La cantidad de fluoresceína se determinó tras incubar las células en presencia de 10 μ M de acetato de fluoresceína durante 1 h a 37°C en presencia o no (Control) de uno de los siguientes compuestos: 10 μ M de verapamilo (Verap), 500 μ M de probenecid (Prob), 50 μ M de ácido taurocólico (TC) y 50 μ M de Hoechst 33342 (HOE). Los valores se representan como medias \pm EEM de los triplicados de 3 cultivos diferentes. * $p < 0,05$ respecto al Control utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni.

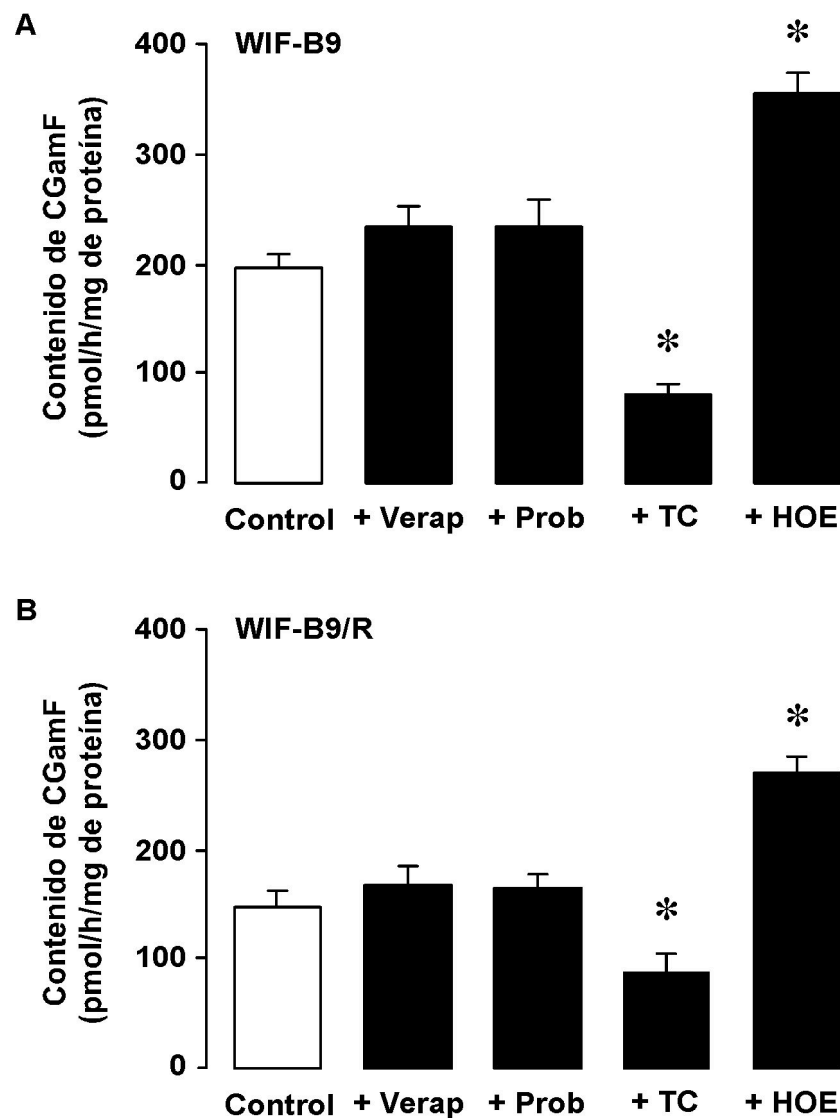


Figura 41. Efecto de diferentes compuestos sobre la acumulación intracelular de colilglicilamido fluoresceína (CGamF) en células WIF-B9 (A) y WIF-B9/R (B). La cantidad de CGamF se determinó tras incubar las células en presencia de 5 μ M de CGamF durante 1 h a 37°C en presencia o no (Control) de uno de los siguientes compuestos: 10 μ M de verapamilo (Verap), 500 μ M de probenecid (Prob), 50 μ M de ácido taurocólico (TC) y 50 μ M de Hoechst 33342 (HOE). Los valores se representan como medias \pm EEM de los triplicados de 3 cultivos diferentes. * $p < 0,05$ respecto al Control utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni.

En la figura 41 se observa que de entre los inhibidores estudiados, únicamente el Hoechst-33342 aumentó de forma estadísticamente significativa el contenido de CGamF en ambas células mientras que se observó una reducción de la acumulación

de este compuesto en presencia del TC, probablemente porque compite con el transportador de carga para la entrada en estas células.

Finalmente, para determinar si las diferencias en los procesos de eflujo se podrían deber a cambios en la carga celular, se estudió el eflujo de CGamF de células previamente cargadas con este compuesto. En la figura 42 se observa que las células WIF-B9/R presentan una mayor capacidad para exportar este compuesto. Además, sólo el sustrato de BCRP Hoechst-33342, pero no los inhibidores de MDR1 y de MRPs, redujo el eflujo de CGamF.

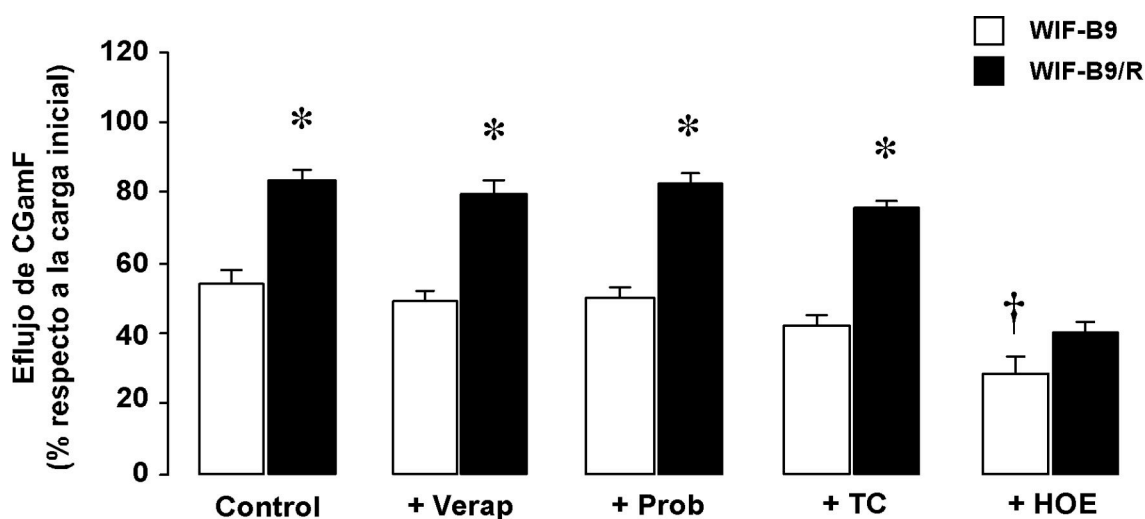


Figura 42. Efecto de distintos compuestos sobre el eflujo de colilglicilamido fluoresceína (CGamF) en células WIF-B9 y WIF-B9/R durante 30 min. La cantidad de CGamF se determinó tras pre-incubar las células durante 1 h con 5 μ M de CGamF en ausencia (Control) o en presencia de los siguientes compuestos: 10 μ M de verapamilo (Verap), 500 μ M de probenecid (Prob), 50 μ M de ácido taurocólico (TC) y 50 μ M de Hoechst 33342 (HOE). A continuación, se colocaban en una cámara termostatzada en un microscopio confocal invertido y se perfundían con medio Tyrode-Hepes a 37°C en presencia o en ausencia de los inhibidores. Los valores se representan como medias \pm EEM de al menos 15 determinaciones realizadas de dos cultivos diferentes. * $p < 0,05$ respecto a WIF-B9 y † $p < 0,05$ respecto al Control utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Aunque no puede descartarse el hecho de que parte del CGamF pueda alcanzar estas estructuras similares a los canalículos biliares a través de una ruta paracelular, estudios previos (Bravo et al., 1998) y los experimentos de eflujo llevados a cabo en este apartado indican que este compuesto es principalmente transportado de manera transcelular desde el medio extracelular a los canalículos biliares. El hecho de que los inhibidores de Mdr1 y Mrp2 probados, verapamilo y probenecid, respectivamente, no inhiban el eflujo de CGamF de las células previamente cargadas con el compuesto, nos sugiere que posiblemente ni Mdr1 ni Mrp2 participan en el transporte de CGamF al canalículo. Sin embargo, puesto que el Hoechst-33342, que es sustrato de BCRP,

fue el único compuesto capaz de inhibir el eflujo de CGamF de las células, sugiere que este derivado de ácido biliar podría ser sustrato de BCRP.

Para confirmar la capacidad de BCRP para transportar ácidos biliares, decidimos utilizar el modelo de expresión heteróloga de proteínas en oocitos de rana *Xenopus laevis* para lo que fue necesario clonar la ORF de BCRP en un vector de expresión adecuado para la síntesis *in vitro* de su ARNm a partir del promotor T7 y a continuación, expresar la proteína en los oocitos tras la inyección de su ARNm en estas células.

4.4.2. Clonación de la BCRP humana y síntesis de su ARNm

La secuencia codificante de BCRP flanqueada por los sitios de restricción *Sall* (en el extremo 5'-terminal) y *NotI* (en el extremo 3'-terminal) se obtuvo por RT-PCR convencional a partir del ARN total extraído de células JAr y se clonó en el vector pGEM-T (apartado 3.7. de Material y Métodos). En la figura 43 A se muestra el esquema del plásmido recombinante generado, denominado pGEM-BCRP.

Para confirmar la presencia de BCRP en el plásmido de origen pGEM-BCRP se llevó a cabo un estudio de restricción con la enzima *PstI* (figura 43 A). Los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos coincidían con los esperados. Una vez clonado el ADNc de BCRP en el vector de origen pGEM-T, se subclonó entre los sitios *NotI* y *Sall* del vector de destino pSPORT1, que es un plásmido adecuado para la síntesis *in vitro* de ARNm. En la figura 36 B se muestra el esquema del plásmido recombinante generado, denominado pSPORT1-BCRP. Para confirmar la identidad del plásmido obtenido, se digirió con las enzimas *SphI* y *PstI* (figura 43 B). Los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos coincidían con los esperados.

Finalmente, mediante secuenciación se determinó que el ADNc de BCRP clonado presentaba casi un 100% de similitud con la secuencia publicada en la base de datos GenBank (BC_021281) (figura 44, Tabla 8). Se encontró una mutación silenciosa en la posición 967 (967C>T), que no alteraba la secuencia de aminoácidos de la proteína. La secuencia de nucleótidos de los cebadores, así como la clave de colores y la región secuenciada en cada caso, se recogen en la tabla 8.

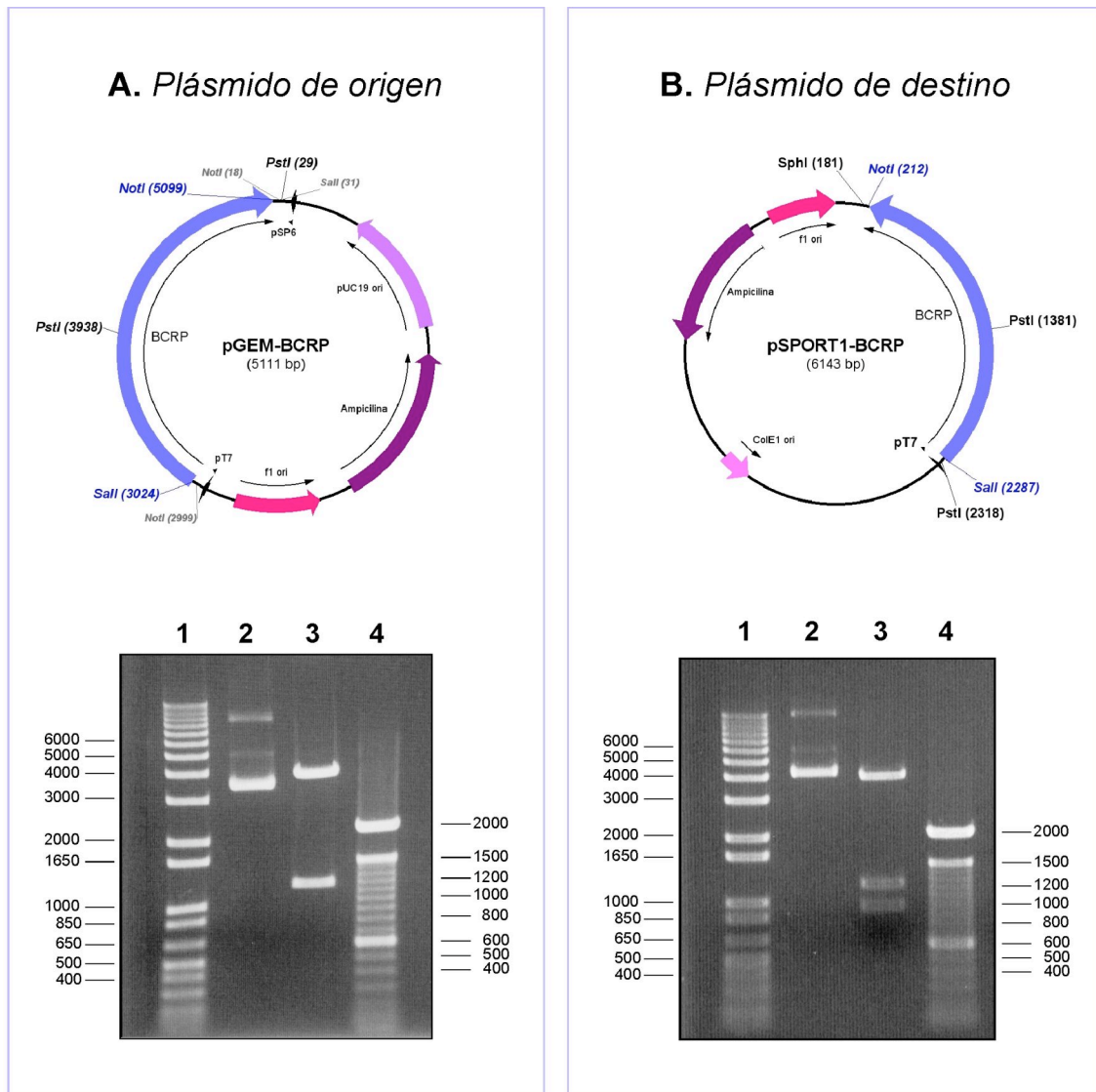


Figura 43. A, mapa del plásmido pGEM-BCRP y separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos de restricción obtenidos tras digestión con *PstI* (calle 3). La calle 2 corresponde al plásmido sin digerir. B, mapa del plásmido pSPORT1-BCRP y separación electroforética en gel de agarosa de los fragmentos de restricción obtenidos tras digestión con *SphI* y *PstI* (calle 3). La calle 2 corresponde al plásmido sin digerir. Las calles 1 y 4 en ambos geles corresponden a los patrones de tamaños de ADN.

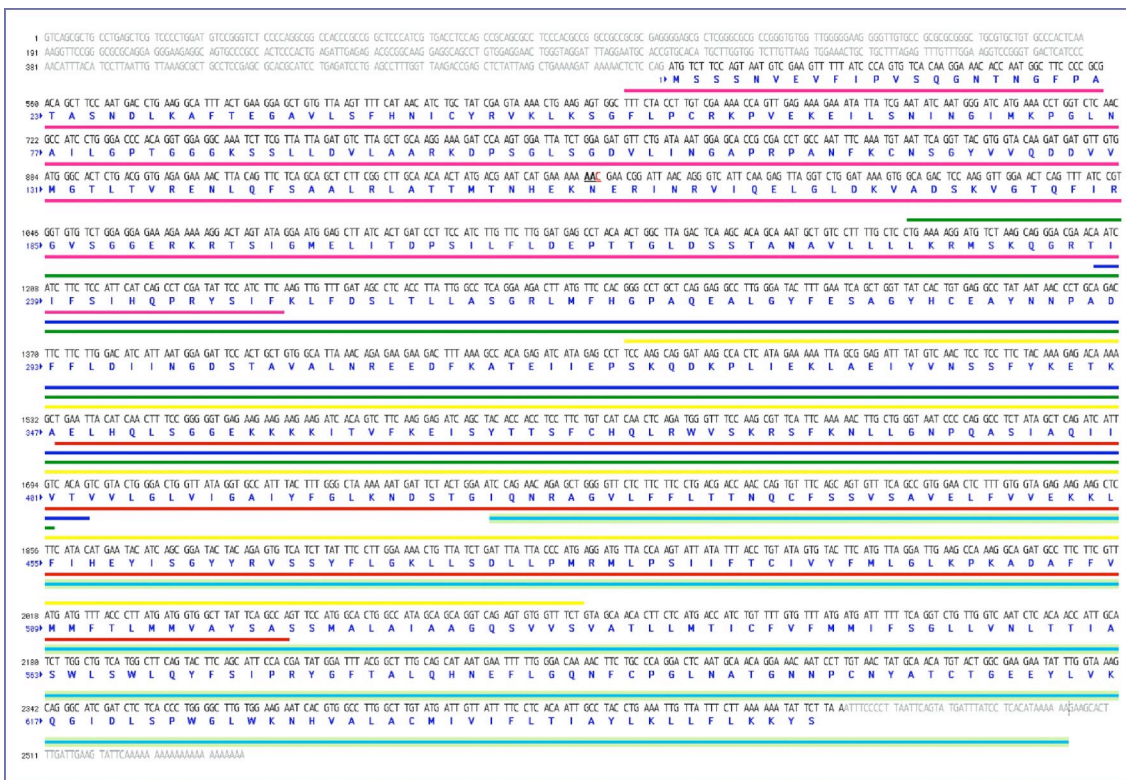


Tabla 8. Oligonucleótidos seleccionados para secuenciar el ADNc de BCRP
(Número de acceso: BC021281, 2547 pb. ORF región 494-2461)

Nombre	Clave	Secuencia (5'→3')	Posición	Región secuenciada	SNPs
Fwd F2		GAGCTCTATTAAGCTGAAAAGATAA	457	486-1243	967C>T
Rev R3		AACCCAGCTCTGTTCTGGATT	1758	1012-1695	
Fwd F3		TTGGATGAGCCTACAAGTGGCTT	1118	1203-1700	
Rev R4		CCTTTGGCTTCAATCCTAACAT	2000	1294-1963	
Fwd F4		CCAAGCAGGATAAGCCACTC	1458	1533-2054	
Rev R2		GAATACCTCAATCAAAGTGCTTC	2503	1760-2502	

Figura 44. Representación de la secuenciación del ADNc de BCRP clonado en el vector pSPORT1 utilizando diferentes oligonucleótidos. Se comparó con la secuencia de la base de datos GenBank con número de acceso BC_021281. La mutación silenciosa encontrada está marcada en color rojo.

Para llevar a cabo la síntesis *in vitro* del ARNm conviene linealizar el plásmido en la región situada a partir del extremo 3' de la ORF clonada. En nuestro caso utilizamos la enzima *NotI* (figura 45 A). Los productos de la reacción de transcripción se separaron por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa (figura 45 B). Se obtuvieron dos bandas de ARN, una del tamaño esperado (≈ 2 kb) y otra más pequeña.

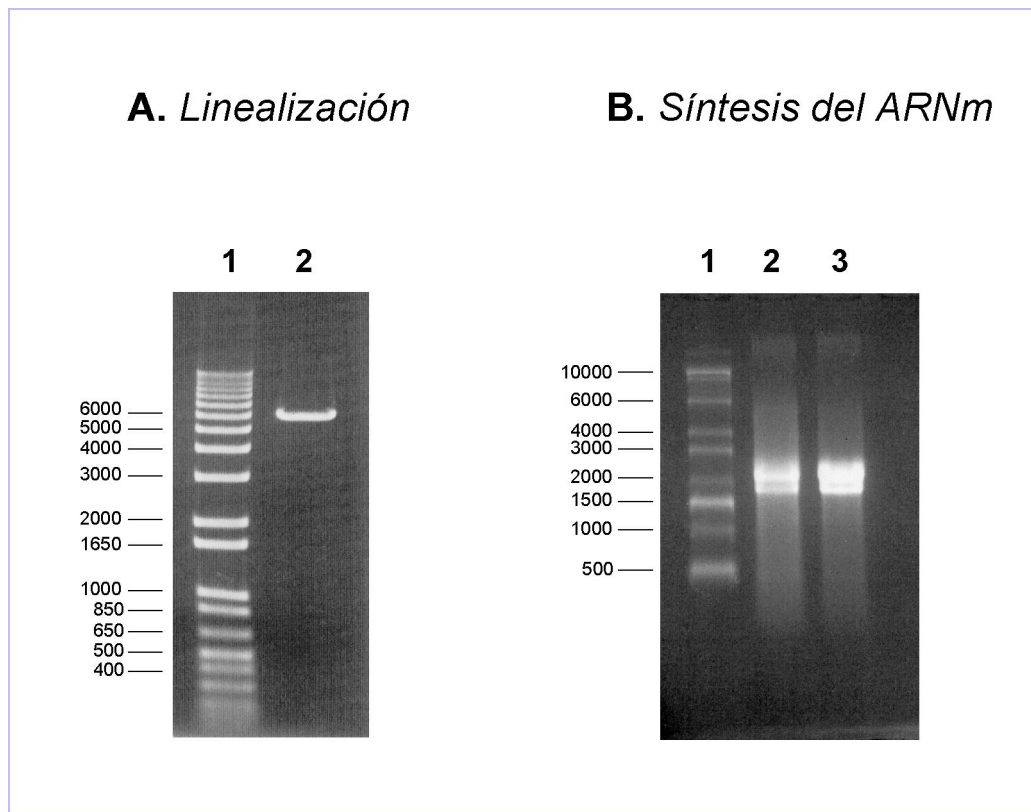


Figura 45. A, electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) del plásmido pSPORT1-BCRP linealizado con *NotI* (calle 2). B, electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% (p/v) del ARNm de BCRP sintetizado a partir del plásmido pSPORT1-BCRP en presencia (calle 3) o en ausencia (calle 2) de proteínas SSB (“single strand binding proteins”). La calle 1 en ambos geles corresponde a la separación del patrón de tamaños de ADN (A) y ARN (B).

La presencia de esta banda más pequeña podría ser debida a que la polimerasa se estaba despegando antes de llegar al codon “stop” de BCRP, posiblemente por el alto contenido en GC, que podrían dar lugar a estructuras secundarias de la cadena de ADN. Para evitar la aparición de estos transcritos truncados se añadió en la reacción de transcripción una mezcla de proteínas de unión a hebra sencilla o SSB (“single strand binding protein”), ya que está descrito que estabilizan la hebra líder de ADN facilitando la transcripción (Ben Aziz y Soreq, 1990).

Como se observa en la figura 45 B, aunque la banda de menor tamaño no desapareció, el rendimiento de la reacción fue mayor.

4.4.2. Expresión funcional de BCRP en oocitos de rana *Xenopus laevis*

Una vez clonada la región codificante de BCRP, el siguiente paso fue comprobar si el ARNm sintetizado traducía una proteína funcional en oocitos. En primer lugar, analizamos su localización en oocitos dos días después de que se microinyectarán con el ARNm de BCRP. Escogimos este tiempo en base a estudios previos con otras bombas ABC y transportadores de membrana plasmática.

En la figura 46, se muestran las imágenes de microscopía confocal de la inmunolocalización de BCRP en cortes de oocitos inyectados con el ARNm de esta bomba. Se observó una fuerte inmunoreactividad en la membrana plasmática de los oocitos que expresaban BCRP, que no aparecía en los oocitos no inyectados.

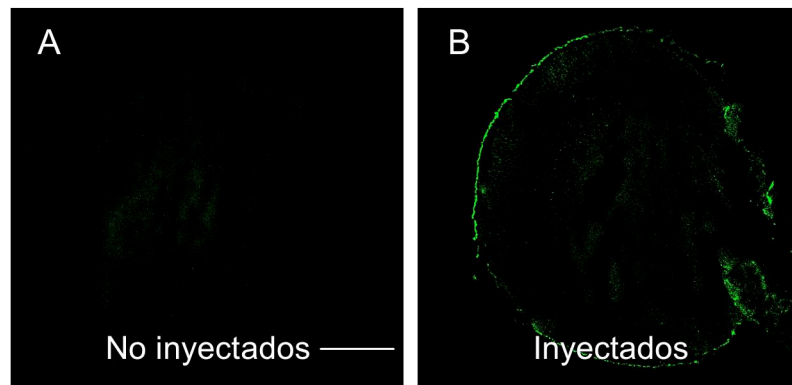


Figura 46. Imágenes de microscopía confocal de la localización por inmunofluorescencia de BCRP en cortes de oocitos silvestres (A) y de oocitos inyectados con el ARNm de BCRP (B). Los oocitos se inyectaron con 7 ng de ARNm de BCRP y se incubaron durante 2 días a 18°C. Barra de escala: 250 µm.

A continuación, se estudió la funcionalidad de BCRP mediante su capacidad para transportar dos sustratos típicos de esta proteína, Hoechst-33342 (Scharenberg et al., 2002) y el fármaco antineoplásico mitoxantrona (MX) (Doyle et al., 1998; Honjo et al., 2001). El Hoechst-33342 entra en las células mediante un mecanismo de difusión simple (Durand, 1982; Shapiro y Ling, 1997) y la MX lo hace mayoritariamente mediante un mecanismo de flip-flop (Breuzard et al., 2005; Regev et al., 2005).

En la figura 47 se muestra la evolución temporal de la acumulación de Hoechst-33342 en oocitos silvestres y en oocitos que expresaban BCRP. Se observa que la acumulación del colorante se saturó tras 1 h de incubación. Los oocitos que expresaban BCRP mostraron una reducción estadísticamente significativa de la acumulación del compuesto respecto a los silvestres. La reducción del contenido de Hoechst-33342 fue aproximadamente de un 55% respecto de los controles al final del

periodo experimental. Se eligió 1 h como tiempo de incubación de los oocitos con Hoechst-33342 para realizar posteriores experimentos.

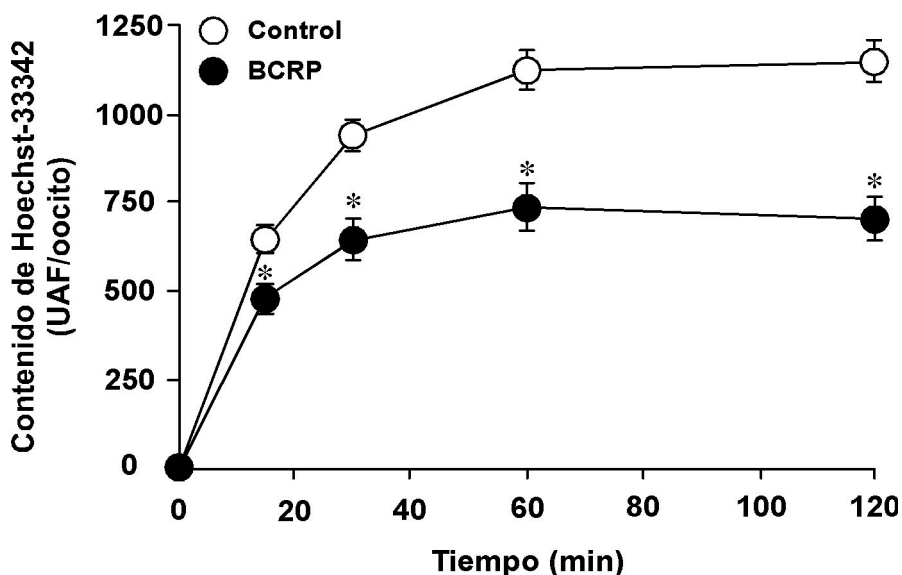


Figura 47. Evolución temporal de la acumulación de Hoechst-33342 en oocitos no inyectados (control) o que expresaban BCRP. Los oocitos se inyectaron con 7 ng de ARNm de BCRP y se incubaron durante 2 días a 18°C. Para llevar a cabo el experimento de captación, los oocitos se incubaron con 200 μ M de Hoechst-33342 a 25°C. Los valores son la medida \pm EEM de 10 oocitos por punto. *, $p < 0,05$ comparado con el contenido de los oocitos control por el *t*-test para valores apareados.

Para evaluar si la disminución de la acumulación observada en los oocitos que expresaban BCRP era debida a un aumento del eflujo de Hoechst-33342, se comparó el contenido celular en presencia o en ausencia de 5 μ M de fumitremorgina C (FTC), un inhibidor específico de esta bomba (Nakanishi et al., 2003; Rabindran et al., 2000).

En la figura 48 se muestra el efecto de FTC sobre el contenido celular de Hoechst-33342 y de mitoxantrona ($[^3\text{H}]$ -MX) en oocitos que expresaban BCRP. Se observa que los oocitos que expresaban la bomba tenían una menor acumulación de ambos compuestos respecto a los controles, encontrándose una reducción del 40% de Hoechst-33342 y del 50% de $[^3\text{H}]$ -MX del contenido de los oocitos control.

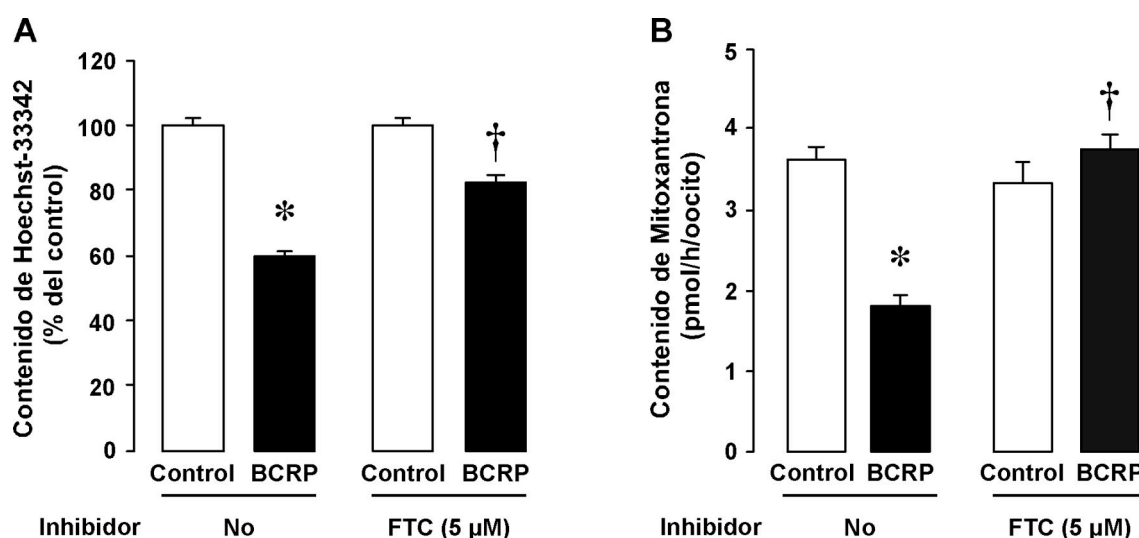


Figura 48. Efecto de la expresión de BCRP en los oocitos de *Xenopus laevis* sobre la acumulación de Hoechst-33342 y mitoxantrona. Los oocitos se inyectaron con 7 ng de ARNm de BCRP y se incubaron durante 2 días a 18°C. Para llevar a cabo el experimento de captación, los oocitos fueron incubados en presencia de 200 µM de Hoechst-33342 (A) o 10 µM de [³H]-Mitoxantrona (B) durante 1 h a 25°C, con o sin 5 µM del inhibidor de BCRP fumitremorgina C (FTC). Los valores representan la media ± EEM de al menos 30 oocitos procedentes de 3 ranas diferentes. *, $p < 0,05$, respecto al contenido de los oocitos control, y †, $p < 0,05$, comparando el contenido de los oocitos que expresan BCRP en presencia o en ausencia de FTC por el *t*-test para valores apareados.

Cuando se añadía FTC al medio de incubación, se reproducía en un aumento de la carga de ambos compuestos en los oocitos que expresaban BCRP que en el caso de la [³H]-MX llegó a alcanzar valores comparables a los encontrados en los controles. En el caso del Hoechst-33342, aunque el aumento del contenido en presencia del inhibidor fue estadísticamente significativo respecto a los valores encontrados en ausencia de FTC, no se alcanzaron los valores encontrados en los oocitos control. La presencia en el medio de incubación del inhibidor no afectó a la acumulación de los compuestos en los oocitos control.

Estos resultados indican que el ARNm de BCRP inyectado en los oocitos traduce para una proteína que presenta la localización característica de membrana plasmática de esta bomba y que además es funcional, ya que es capaz de transportar dos sustratos típicos de esta proteína. Además, este efecto es revertido por la presencia en el medio de incubación de un inhibidor específico como es FTC.

4.4.3. Capacidad de BCRP expresada en oocitos de rana *Xenopus laevis* para transportar ácidos biliares

Para poder determinar el eflujo de compuestos como los ácidos biliares que no entraban por difusión en los oocitos, previamente se cargaban los sustratos directamente en los oocitos que expresaban la proteína transportadora mediante microinyección (Gerloff et al., 1998; Shneider y Moyer, 1993), e inmediatamente después se llevaban a cabo los experimentos para determinar la actividad exportadora de la proteína midiendo la desaparición del compuesto de estas células con el tiempo.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una nueva estrategia que utiliza la capacidad de difusión de los ésteres metílicos de ácidos biliares para cargar los oocitos (Vallejo et al., 2006). A continuación la enzima carboxil esterasa humana 1 (hCE1), que se co-expresa junto con la bomba ABC, se encarga de hidrolizar estos ácidos biliares metilados que quedan libres en el citoplasma para ser transportados por la bomba ABC.

En este trabajo de Tesis Doctoral planteamos una nueva variante que se basa en la co-expresión de un transportador de carga de aniones orgánicos junto con una bomba ABC.

Escogimos como transportador de carga el Oatp1a1, ya que es la isoforma de Oatp que tiene una mayor eficacia de transporte para ácidos biliares (Hagenbuch y Meier, 2004; Satlin et al., 1997).

Para determinar la funcionalidad del modelo, co-inyectamos el ARNm sintetizado *in vitro* del Oatp1a1 junto con el ARNm de Bsep o de Mrp2, ya que ambas bombas son las principales responsables del transporte de aniones orgánicos colefílicos al canalículo biliar.

En la figura 49 se muestra el contenido celular de dos sustratos típicos del Oatp1a1, el ácido taurocólico ($[^3\text{H}]\text{-TC}$) y el 17 β -glucurónido de estradiol ($[^3\text{H}]\text{-17}\beta\text{GE}$), marcados radiactivamente. Como cabía esperar, la expresión de Oatp1a1 en los oocitos produjo un aumento significativo del contenido celular de ambos compuestos respecto a los oocitos control.

Por otra parte, la co-expresión de Oatp1a1 con Bsep (figura 49 A) o con Mrp2 (figura 49 B) produjo una reducción del contenido de TC o de 17 β GE, respectivamente, que se explica por la capacidad de estas bombas para exportar estos compuestos al medio extracelular.

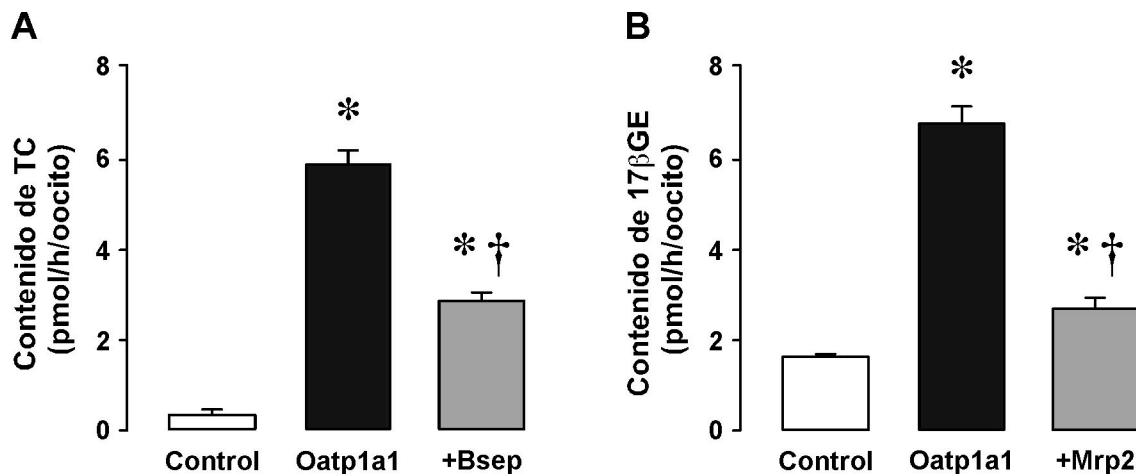


Figura 49. Caracterización funcional del modelo de co-expresión de un transportador de carga y una bomba ABC de eflujo en oocitos de *Xenopus laevis*. Los oocitos se inyectaron 2 días antes de la realización de los experimentos con el ARNm de Oatp1a1 sólo o junto con el Bsep (A) o de Mrp2 (B). Para llevar a cabo los experimentos de captación, los oocitos fueron incubados en presencia de 50 μ M de [3 H]-ácido taurocólico ([3 H]-TC) (A) ó 10 μ M de [3 H]-17 β glucuronido de estradiol ([3 H]-17 β GE) (B) durante 1 h a 25°C. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 30 oocitos procedentes de 3 ranas diferentes. *, $p < 0,05$, respecto al contenido de los oocitos control mediante el test de comparación múltiple de Bonferroni. †, $p < 0,05$, comparando el contenido de los oocitos que expresan sólo Oatp1a1 por el t -test para valores apareados.

El balance entre la capacidad de carga del Oatp1a1 y la capacidad de eflujo de las bombas determina el contenido del compuesto en los oocitos.

Estos resultados demuestran que la co-expresión de bombas ABC y un transportador Oatp permite cargar ácidos biliares y otros esteroides en estas células y además nos permite determinar el eflujo mediado por las bombas ABC.

Una vez determinada la funcionalidad del modelo, se pasó a determinar la capacidad de BCRP para transportar ácidos biliares.

La co-expresión de Oatp1a1 y BCRP en los oocitos no modificó la localización de membrana característica de BCRP (figura 50), ni tampoco su actividad funcional determinada por su capacidad para expulsar MX (datos no mostrados).

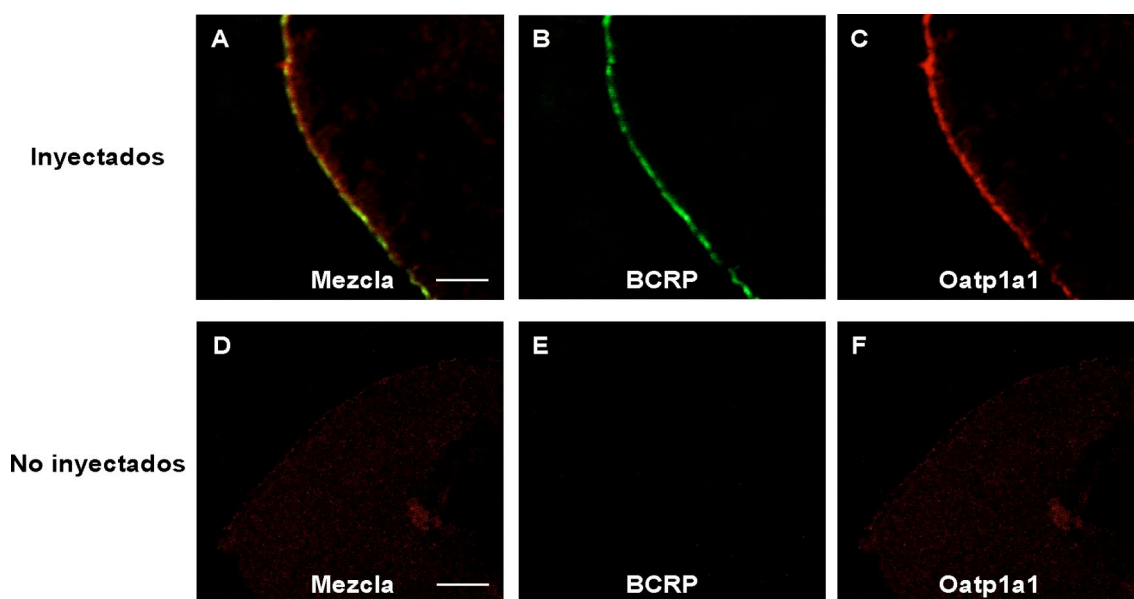


Figura 50. Imágenes de microscopía confocal de la localización por inmunofluorescencia de BCRP y Oatp1a1 en cortes de oocitos no inyectados (D - F) y de oocitos co-inyectados con el ARNm de BCRP y de Oatp1a1 2 días antes (A - C). A y D muestran la superposición del marcaje de BCRP (en verde) y de Oatp1a1 (en rojo). Barras de escala: 100 μ m.

Como posibles sustratos de BCRP, se escogieron ácidos biliares primarios no conjugados, como el ácido cólico (AC), y conjugados con glicina, como el ácido glicocólico (GC), o con taurina, como el TC, ya que son de los más abundantes dentro del “pool” de ácidos biliares en bilis.

Como una primera aproximación, y para determinar las mejores condiciones para estudiar la capacidad de BCRP de transportar ácidos biliares, se inyectaron los oocitos con 7 ng del ARNm de Oatp1a1 y 7 ng del ARNm BCRP, lo que supone una relación 1 a 1 de la cantidad de ARNm inyectada de ambos transportadores, o con una relación 1 a 3 de la cantidad de ARNm inyectada favoreciendo la expresión de la bomba (4 ng del ARNm de Oatp1a1 y 12 ng del ARNm de BCRP).

En la figura 51 se muestra el eflujo de ácidos biliares primarios marcados radiativamente mediado por BCRP o por Bsep, en oocitos co-inyectados con el ARNm de Oatp1a1 y el ARNm de BCRP o de Bsep (relación 1:1 ó 1:3).

Se observa que BCRP exportó eficazmente todos los ácidos biliares primarios probados del mismo modo que el control positivo, Bsep. Cuando el balance de la mezcla de los ARNm inyectada en los oocitos favorecía la expresión de las bombas ABC frente al Oatp1a1 (mezcla 1:3, Oatp1a1:ABC), esto se traducía en un aumento estadísticamente significativo del eflujo de los ácidos biliares mediado por BCRP y por Bsep, respecto a la relación 1:1 de los ARNm. En el caso de BCRP, salvo para el ácido biliar GC, se observó un incremento del eflujo de aproximadamente 2 veces para

el TC y 4 veces para el AC, respecto a los valores obtenidos con la relación 1:1 de los ARNm.

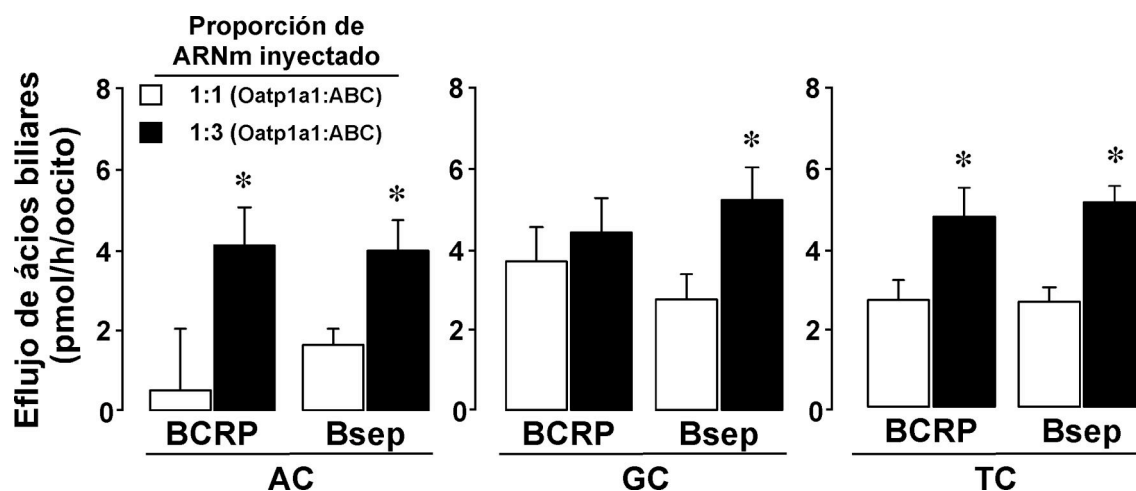


Figura 51. Eflujo de ácidos biliares mediado por BCRP y Bsep en oocitos de *Xenopus laevis*. Los oocitos se inyectaron 2 días antes de la realización de los experimentos con una mezcla de los ARNm de Oatp1a1 y de BCRP o de Bsep, en proporción 1:1 (Oatp1a1:ABC, barras blancas) y 1:3 (Oatp1a1:ABC, barras negras). Los oocitos se incubaron en presencia de 50 μ M de [3 H]-ácido cólico ([3 H]-AC), 50 μ M de [3 H]-ácido glicocólico ([14 C]-GC) ó 50 μ M de [3 H]-ácido taurocólico ([3 H]-TC), durante 1 h a 25°C. El eflujo se determinó como la diferencia de contenido de cada ácido biliar medida en los oocitos que co-expresaban las bombas ABC y Oatp1a1 respecto a los oocitos que sólo expresaban Oatp1a1. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 20 oocitos procedentes de 3 ranas diferentes. * $p < 0,05$, respecto al contenido de los oocitos inyectados con la relación 1:1 de los ARNm por el t -test para valores apareados.

Estos resultados sugieren que BCRP puede transportar ácidos biliares primarios libres y conjugados y que además, cuando se favorece la expresión de la bomba ABC respecto al transportador de carga, se observa un efecto más claro de la acción de las proteínas exportadoras. Por eso, en los sucesivos experimentos se decidió utilizar la relación de cantidad 1:3 en la mezcla de ARNm (Oatp1a1:ABC).

Puesto que está descrito que BCRP transporta preferentemente compuestos sulfatados (Imai et al., 2003; Suzuki et al., 2003), para ampliar este estudio nos planteamos determinar si los ácidos biliares sulfatados, como el ácido taurosulfolitocólico (TSLC), también serían sustratos de BCRP.

En la figura 52 se muestra el contenido celular de TSLC determinado por LC-MS-MS (ver apartado 3.12.11 de Material y Métodos) en oocitos que expresaban Oatp1a1 sólo o junto con BCRP. Se observa que la expresión de Oatp1a1 en los oocitos aumentó de forma significativa el contenido de este ácido biliar respecto a los oocitos control. Además, la co-expresión con BCRP produjo una reducción de aproximadamente el

50% del contenido de TSLC detectado en los oocitos que expresaban sólo Oatp1a1, indicando que BCRP estaría expulsando este compuesto al medio extracelular.

Cuando se añadió al medio de incubación el inhibidor de BCRP (5 μ M de FTC) esto produjo un aumento significativo de la carga de TSLC en los oocitos que expresaban BCRP respecto a los valores encontrados en ausencia de FTC. La presencia en el medio de incubación del inhibidor no afectó al transporte de TSLC mediado por Oatp1a1.

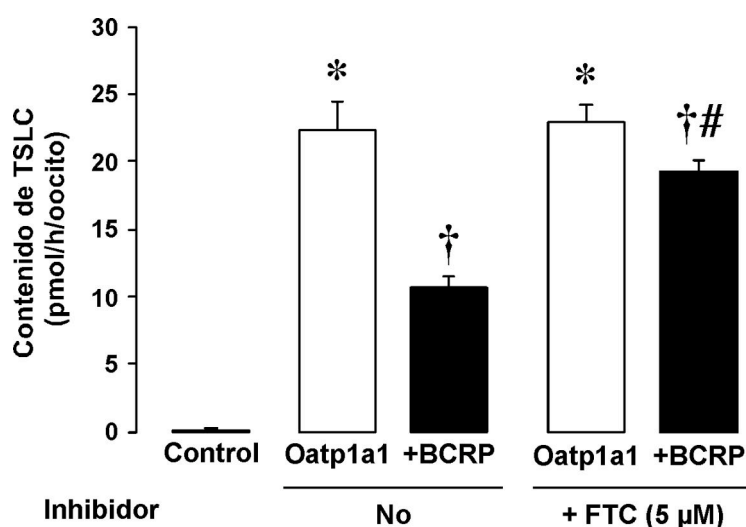


Figura 52. Efecto de FTC sobre el transporte de ácido taurosulfolitocólico (TSLC) mediado por BCRP en oocitos de *Xenopus laevis*. Los oocitos se inyectaron 2 días antes de la realización de los experimentos con el ARNm de Oatp1a1 sólo (barras blancas) o junto con el ARNm de BCRP (barras negras). Para llevar a cabo los experimentos de captación, los oocitos fueron incubados con 50 μ M de TSLC durante 1 h a 25°C en presencia o en ausencia de 5 μ M FTC. Los valores representan la media \pm EEM de entre 15 a 30 oocitos procedentes de 3 ranas diferentes. *, $p < 0,05$, respecto al contenido de los oocitos control (no inyectados) mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. †, $p < 0,05$, comparando con el contenido de los oocitos que expresan sólo Oatp1a1 por el t -test para valores apareados. #, $p < 0,05$, comparando con el contenido de los oocitos que expresan BCRP en ausencia de FTC por el test de t de Student para valores apareados.

Para confirmar la capacidad de BCRP de transportar TSLC decidimos cargar los oocitos con el ácido biliar marcado radiativamente mediante microinyección individual y analizar la reducción mediada por BCRP del contenido radiactivo a lo largo del tiempo.

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis de [14 C]-TSLC, a partir del ácido sulfolitocólico (SLC) y la [14 C]-taurina mediante una modificación del método de Momose (Momose et al., 1997), tal y como se explica en el apartado 3.2.1. de Material y Métodos. En la figura 53 se muestra el espectro de RMN de 1 H del TSLC sintetizado.

Mediante este estudio se pueden observar los desplazamientos de las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno más relevantes de esta molécula. Estos hidrógenos son los correspondientes a los metilos situados en los carbonos 18, 19 y 21 del núcleo esteroideo del ácido biliar (SLC) y los hidrógenos de los carbonos 2 y 3 de la taurina. La señal correspondiente al hidrógeno del enlace amida formado entre el SLC y la taurina aparece como un triplete entorno a δ 4.8.

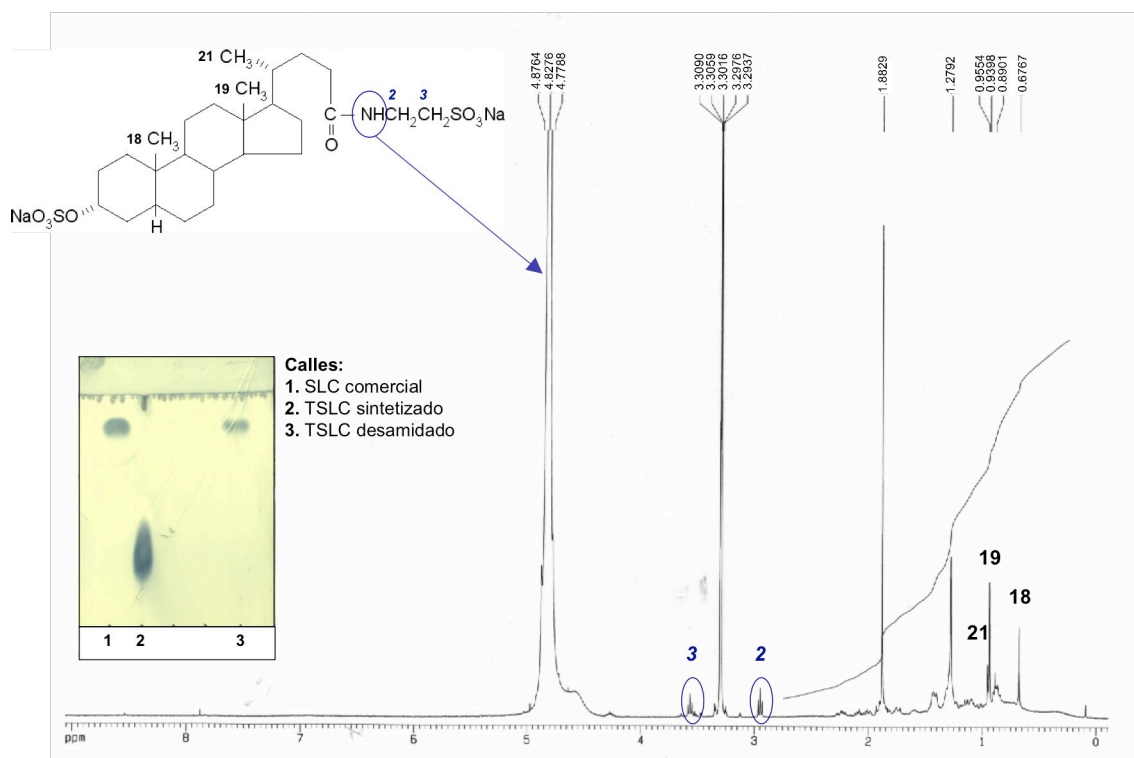


Figura 53. Espectro de RMN de ^1H del TSLC sintetizado y purificado. Las señales específicas del grupo sulfato y la taurina están marcadas numéricamente. El inserto muestra la separación cromatográfica por TLC del producto de la reacción de desamidación del TSLC sintetizado. Los compuestos se visualizaron con ácido fosfomolibdico. Calles 1 y 2: patrones de SLC y de TSLC sintetizado. Calle 3: TSLC sintetizado desamidado.

La formación del enlace amida también se confirmó sometiendo al producto de la síntesis a una reacción de desamidación y comparando el producto desamidado con el SLC de partida mediante separación por cromatografía de capa fina y visualización con ácido fosfomolibdico que tiñe los grupos hidroxilo del ácido biliar. El resultado de este análisis está inserto en la figura 53. Utilizando como fase móvil cloroformo/metanol/ácido acético/agua destilada (64:25:15:2, v/v) se encontró que el coeficiente de retención (R_f) para el producto sintetizado (calle 2) fue de 0,46 mientras que el R_f del SLC comercial de partida fue 0,87. Tras la reacción de desamidación catalizada por la enzima colilglicil hidrolasa encontramos que el producto sintetizado desamidado (calle 3) aparece con un R_f igual al SLC (0,87). Este resultado junto con

el RMN de ^1H confirmaron la formación del enlace amida entre el SLC y la taurina por lo que concluimos que el producto que aparece con un R_f de 0,46 es TSLC.

A continuación, en la figura 54 se determinó la evolución temporal del contenido del $[^{14}\text{C}]$ -TSLC de los oocitos previamente cargados por microinyección. Se observa que tanto la expresión de BCRP como la de Bsep produjeron una marcada disminución del contenido celular de $[^{14}\text{C}]$ -TSLC respecto a los oocitos controles, llegando a observarse en ambos grupos una reducción de un 20% al final del periodo experimental. Por el contrario, en el grupo control no se observó ninguna variación del contenido radiactivo a lo largo del tiempo. Además, el contenido de $[^3\text{H}]$ -inulina, utilizada como indicativo de la salida inespecífica a través del pequeño agujero de la membrana producido por la microinyección, se mantuvo constante durante todo el periodo experimental.

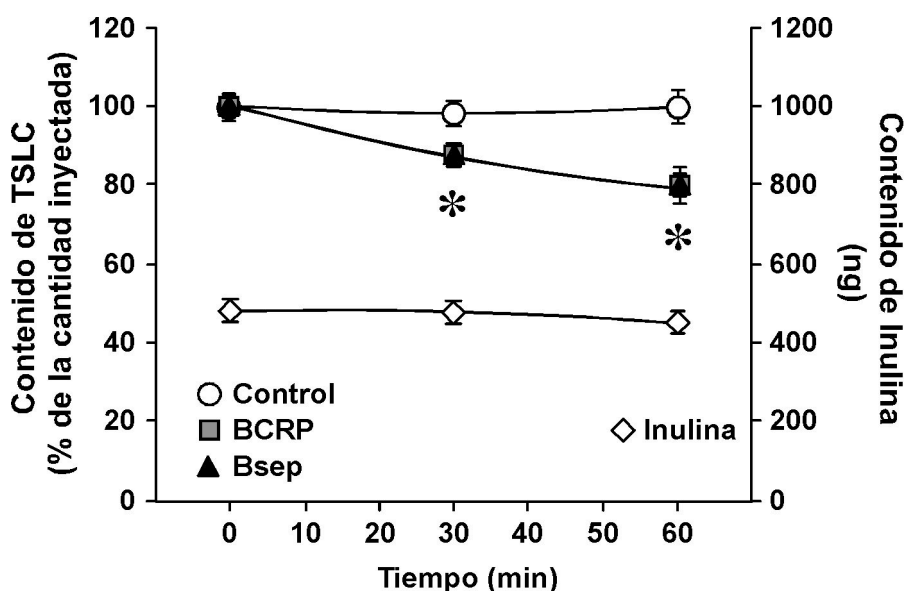


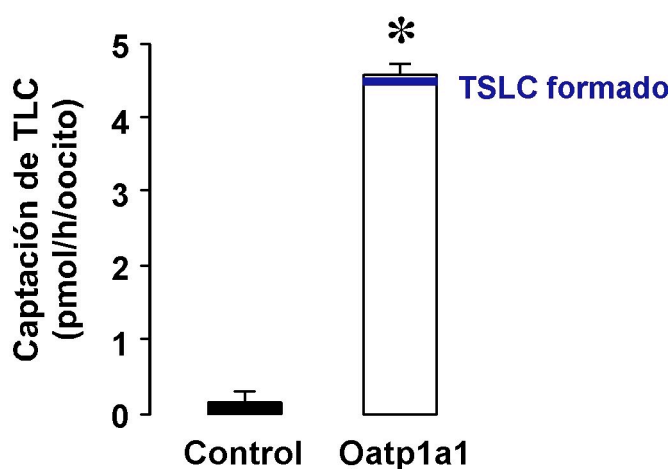
Figura 54. Evolución temporal de la reducción del contenido de $[^{14}\text{C}]$ -TSLC en oocitos previamente cargados por microinyección. Dos días antes de realizar los experimentos los oocitos se inyectaron con el ARNm de BCRP (cuadrados) o de Bsep (triángulos). Para realizar los experimentos, los oocitos se microinyectaron con 50 nl de una solución que contenía 100 μM de $[^3\text{H}]$ -inulina (rombos) y 300 μM de $[^{14}\text{C}]$ -TSLC antes de ser incubados en el medio de eflujo durante 1 h a 25°C. Los valores son medias \pm EEM de al menos 15 determinaciones por punto usando oocitos de dos ranas diferentes. *, $p < 0,05$ comparando con el contenido de los oocitos control (círculos) por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Estos resultados confirman que este ácido biliar sulfatado es otro sustrato de BCRP. Sin embargo, en este punto nos planteamos si esta bomba ABC era capaz de transportar ácidos biliares primarios o si en realidad los oocitos tenían suficiente capacidad de sulfatación de estas moléculas y el eflujo mediado por BCRP que se

observaba en la figura 51 se debía más bien a el transporte de sus derivados sulfatados.

La identificación y cuantificación tanto del ácido biliar de partida como del derivado sulfatado producido por los oocitos se realizó mediante LC-MS-MS. Escogimos como ácido biliar de partida el ácido taurolitocólico (TLC). Oocitos control (no inyectados) como los que expresaban Oatp1a1 se incubaron durante 1 h en presencia de 5 μ M de TLC.

Figura 55. Capacidad de sulfatación de ácidos biliares en oocitos de *X. laevis*. Los oocitos se inyectaron 2 días antes de la realización de los experimentos con el ARNm de Oatp1a1. Los oocitos fueron incubados en presencia de 5 μ M de taurolitocólico (TLC) durante 1 h a 25°C. La detección y el contenido celular del TLC y del TSLC producido por el metabolismo de los oocitos (marcado en azul), se determinó por LC-MS-MS. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 5 muestras diferentes. * $p < 0,05$, respecto al contenido de TLC de los oocitos control (no inyectados) mediante el *t*-test para valores apareados.



En la figura 55 se observa que el Oatp1a1 transportó eficazmente el TLC al interior de los oocitos produciendo un aumento estadísticamente significativo del contenido intracelular de TLC en estas células respecto a los oocitos control. La determinación por LC-MS-MS del TSLC producido por el metabolismo de los oocitos durante el periodo experimental, reveló que sólo un 1,7% del TLC captado era transformado a TSLC (0,08 pmol/h/oocito). Este pequeño porcentaje no explica el eflujo de ácidos biliares primarios mediado por BCRP que veíamos en la figura 51.

En estudios previos, utilizando células de mamífero, se había demostrado que el TC y el TSLC interaccionaban con esta proteína e inhibían el transporte mediado por BCRP de esteroides como la estrona sulfato y la DHEAS (Imai et al., 2003; Suzuki et al., 2003). Sin embargo, no pudieron demostrar que estos ácidos biliares fueran también sustratos de BCRP.

Los primeros indicios de la capacidad de BCRP para transportar ácidos biliares se describieron en un trabajo reciente utilizando un modelo de expresión heteróloga de proteínas en bacterias Gram positivas *Lactococcus lactis*, donde observaron que la

presencia de BCRP reducía el contenido celular de AC y además, determinaron que algunos ácidos biliares estimulaban la actividad ATPasa de la proteína (Janvilisri et al., 2005).

En conjunto nuestros resultados sugieren que BCRP puede transportar ácidos biliares primarios (libres y conjugados) y ácidos biliares sulfatados, como el TSLC, por lo tanto estos resultados contribuyen a aumentar el amplio abanico de sustratos que hasta la fecha se han descrito para esta bomba ABC.

4.4.4. Efecto del 17 β GE sobre la funcionalidad de BCRP expresada en oocitos de rana *Xenopus laevis*

Estudios previos llevados a cabo en células de mamífero demostraron que algunos esteroides, principalmente esteroides sulfatados, mostraban un efecto inhibitor sobre el transporte mediado por BCRP tanto de fármacos antitumorales, como la MX, como de sustratos fisiológicos de esta proteína, como la estrona sulfato (Imai et al., 2003; Imai et al., 2002). Aunque estos investigadores no encontraron un efecto inhibitor claro del 17 β GE.

Por otra parte, se ha descrito que diversos esteroides colestáticos, entre los que se encuentra el 17 β GE, tienen un efecto inhibitor sobre la actividad de otras bombas ABC, como la Bsep y Mrp2 (Stieger et al., 2000; Vallejo et al., 2006).

A partir de estos indicios, nos planteamos estudiar el posible efecto inhibitor del 17 β GE sobre la actividad de BCRP expresada en oocitos de *Xenopus laevis*.

En base a estudios previos, al rango de concentraciones habitualmente utilizado para la realización de experimentos de inhibición del transporte (Vallejo et al., 2006) y teniendo en cuenta que la concentración de 30 μ M de 17 β GE no inhibía la funcionalidad de BCRP en células de mamífero (Imai et al., 2003), escogimos la concentración de 50 μ M de 17 β GE para llevar a cabo este estudio. En la figura 56 se muestra el efecto del 17 β GE sobre el eflujo de MX mediado por BCRP. FTC se utilizó como control positivo de la inhibición de BCRP.

Como cabía esperar, la expresión de BCRP en los oocitos produjo una clara reducción del contenido de MX (aproximadamente en un 40% respecto al control) que se revirtió totalmente en presencia de FTC. La presencia de FTC en el medio de incubación no tuvo ningún efecto sobre el contenido de MX de los oocitos control, aunque se observó una reducción de su contenido cuando se incubaron en presencia del 17 β GE. Por otra parte, aunque se observó una disminución del contenido de MX en los oocitos que expresaban BCRP en presencia del 17 β GE y sus controles, esta disminución no llegó a ser estadísticamente significativa.

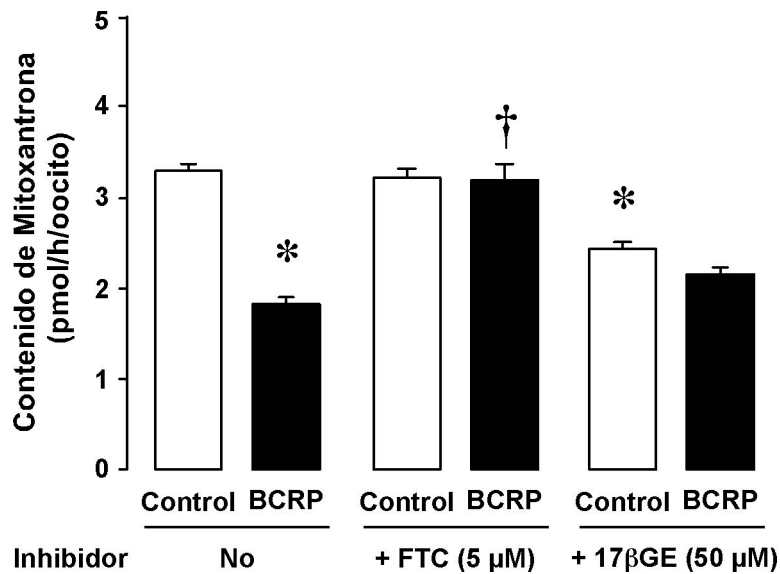


Figura 56. Efecto del 17β-glucurónido de estradiol (17βGE) sobre el transporte de mitoxantrona mediado por BCRP en oocitos de *Xenopus laevis*. Los oocitos se inyectaron 2 días antes de la realización de los experimentos con el ARNm de BCRP (barras negras). Los oocitos se incubaron con 10 μM de [³H]-mitoxantrona en presencia o en ausencia de 5 μM de FTC ó 50 μM de 17βGE 1 h a 25°C. Los valores representan la media ± EEM de al menos 30 oocitos procedentes de 3 ranas diferentes. *, p<0,05, respecto al contenido de los oocitos control en ausencia de inhibidores mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. †, p<0,05, comparando con el contenido de los oocitos que expresan BCRP en ausencia de inhibidores por el t-test para valores apareados.

Estos resultados indican que probablemente el 17βGE interaccione con BCRP produciendo una inhibición, aunque no total, del eflujo de MX mediado por esta bomba ABC.

Está descrito que en situaciones que cursan con colestasis se produce un aumento de la sulfatación de ácidos biliares (Makino et al., 1975). Por eso, para ampliar este estudio, decidimos analizar el efecto de este esteroide colestático sobre el eflujo de [¹⁴C]-TSLC mediado por BCRP.

En la figura 57 se muestran los resultados del efecto del 17βGE sobre el eflujo de TSLC mediado por BCRP en oocitos previamente cargados por microinyección. Se ha descrito que este esteroide trans-inhibe la bomba Bsep (Stieger et al., 2000; Vallejo et al., 2006). Por esta razón, nos pareció apropiado utilizar esta proteína como control positivo de la trans-inhibición mediada por 17βGE.

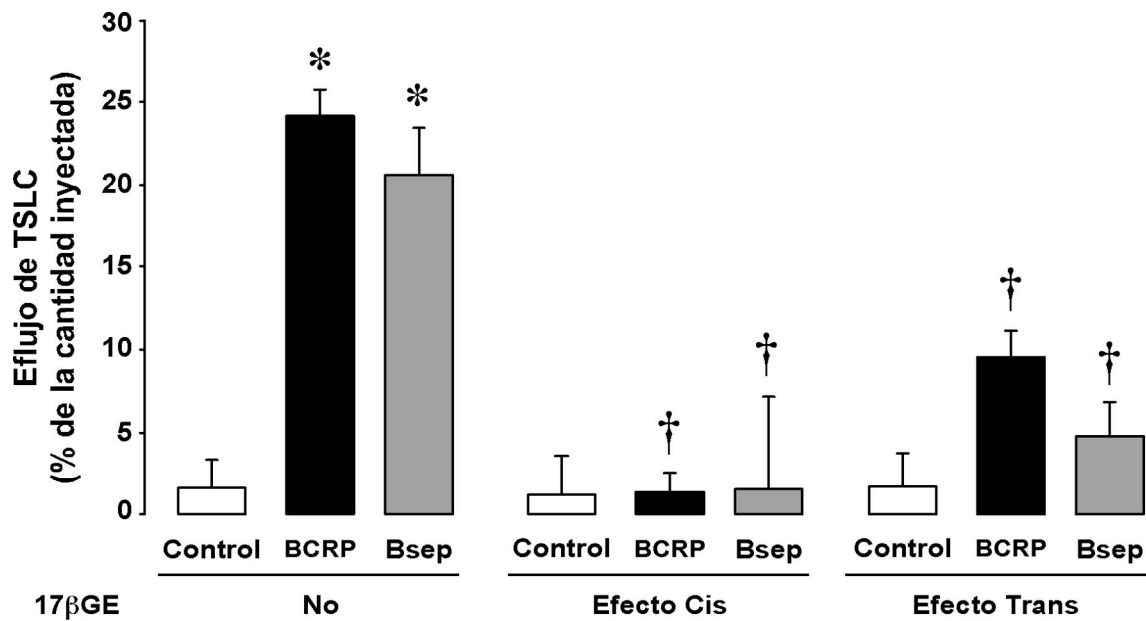


Figura 57. Efecto del 17β-glucurónido de estradiol (17βGE) sobre el eflujo de [¹⁴C]-TSLC en oocitos previamente cargados por microinyección. Dos días antes de realizar los experimentos los oocitos se inyectaban con el ARNm de BCRP (barras negras) o de Bsep (barras grises). Los oocitos se cargaron con 50 nl de una solución que contenía 150 μM de [¹⁴C]-TSLC sólo o junto con 750 μM de 17βGE (Efecto Cis) antes de ser incubados en el medio de eflujo en presencia (Efecto Trans) o en ausencia de 50 μM de 17βGE durante 1 h a 25°C. Los valores representan la media ± EEM de al menos 30 oocitos procedentes de 3 ranas diferentes. *, p<0,05, respecto al eflujo de los oocitos control en ausencia de 17βGE y †, p<0,05, comparando con el eflujo mediado por BCRP o Bsep en ausencia de 17βGE por el test de comparaciones múltiples Bonferroni.

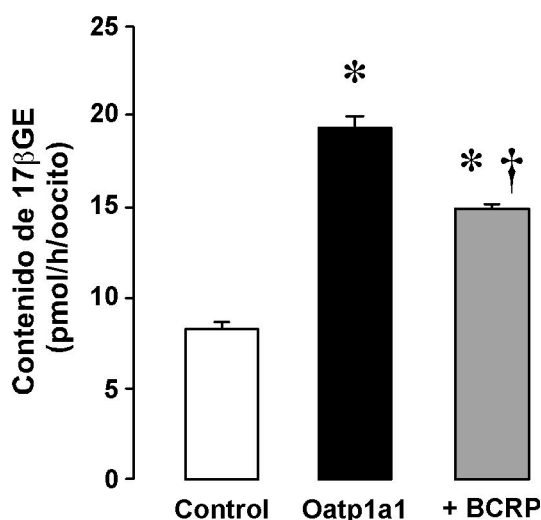
Al igual que en la figura 53, la expresión de BCRP y Bsep en los oocitos condujo a un incremento estadísticamente significativo del eflujo del TSLC inyectado en comparación con los oocitos control. Cuando en el medio de eflujo se añadió 17βGE, se observó una reducción del eflujo mediado por ambas bombas, siendo ligeramente más pronunciado este efecto para Bsep. Por otro lado, cuando este esteroide se co-inyectó con el ácido biliar produjo una inhibición del eflujo que llegó a ser casi total para ambas bombas.

Este efecto cis-inhibidor tan pronunciado que observamos sobre BCRP nos llevó a pensar que este esteroide también podría ser un sustrato de esta bomba. Puesto que se han descrito resultados contradictorios sobre la capacidad de esta proteína para transportar el 17βGE (Chen et al., 2003; Grube et al., 2007; Imai et al., 2003; Suzuki et al., 2003), nos planteamos analizar si este estrógeno colestático era otro sustrato de BCRP.

En la figura 58 se muestra el contenido de [3 H]-17 β GE en oocitos que expresan Oatp1a1 sólo o con BCRP.

Se observa que Oatp1a1 transportó eficazmente el 17 β GE y que la expresión con BCRP produjo una disminución de aproximadamente un 20% del contenido del 17 β GE detectado en los oocitos que sólo expresaban el transportador de carga Oatp1a1.

Figura 58. Contenido de 17 β -glucurónido de estradiol (17 β GE) en oocitos que expresan Oatp1a1 solo o junto con BCRP. Los oocitos se incubaron en presencia de 10 μ M de [3 H]-17 β GE durante 1 h a 25°C. Los valores representan la media \pm EEM de al menos 30 oocitos procedentes de 3 ranas diferentes. *, $p < 0,05$, respecto al contenido de los oocitos control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. †, $p < 0,05$, comparando con el contenido de los oocitos que expresaban sólo Oatp1a1 por el t -test para valores apareados.



Estos resultados sugieren que este esteroide es también sustrato de BCRP y por lo tanto podría competir por el transporte de TSLC lo que fue explicado el efecto cis-inhibidor del mismo sobre el transporte del ácido biliar.

El hecho de que otros grupos no hayan encontrado un efecto inhibidor del 17 β GE sobre el transporte mediado por BCRP (Imai et al., 2003; Suzuki et al., 2003), podría explicarse teniendo en cuenta que se ha descrito que BCRP, al igual que MDR1, podría presentar varios sitios de unión a sustrato y que en función de la interacción de los sustratos con la proteína podría verse un efecto inhibidor o no (Giri et al., 2009; Nakanishi et al., 2003).

Como hemos comentado, el efecto trans-inhibidor del 17 β GE sobre Bsep ya se había descrito con anterioridad (Stieger et al., 2000; Vallejo et al., 2006). Sin embargo no se había llegado a detectar el efecto cis-inhibidor de este esteroide colestático sobre Bsep.

En conjunto, este último bloque de resultados sugieren que BCRP podría jugar un papel en la secreción de ácidos biliares a bilis, como una ruta alternativa a BSEP cuando la expresión de esta proteína y/o su función estuviesen disminuidas como ocurre en ciertas situaciones de colestasis, siempre y cuando no se deban a una

inhibición por esteroides colestáticos ya que como hemos visto, éstos también pueden inhibir la capacidad de transporte de BCRP.

En el trofoblasto, su papel en el transporte de ácidos biliares fetales podría ser más relevante dada la elevada expresión de BCRP en este tejido y la baja expresión de BSEP. Además, la placenta tiene una alta tasa de sulfatación (Marin et al., 2004), por lo que podría participar en la destoxificación de derivados sulfatados de los ácidos biliares fetales.

Por otra parte, la capacidad de BCRP para exportar el 17 β GE sugiere que podría tener un papel importante en la protección del feto frente a la acumulación de este tipo de esteroides endógenos, mientras que en el hígado podría contribuir a la secreción biliar de este compuesto mediada por la actividad de MRP2 (Morikawa et al., 2000).

- Abrahamsson, A., U. Gustafsson, E. Ellis, L.M. Nilsson, S. Sahlin, I. Bjorkhem, and C. Einarsson. 2005. Feedback regulation of bile acid synthesis in human liver: importance of HNF-4alpha for regulation of CYP7A1. *Biochem Biophys Res Commun.* 330:395-9.
- Akita, H., H. Suzuki, K. Ito, S. Kinoshita, N. Sato, H. Takikawa, and Y. Sugiyama. 2001. Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta.* 1511:7-16.
- Akiyama TE, Gonzalez FJ. 2003. Regulation of P450 genes by liver-enriched transcription factors and nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta* 1619: 223-34.
- Aleksunes LM, Champion SN, Goedken MJ, Manautou JE. 2008a. Acquired resistance to acetaminophen hepatotoxicity is associated with induction of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4) in proliferating hepatocytes. *Toxicol Sci* 104: 261-73.
- Aleksunes LM, Scheffer GL, Jakowski AB, Pruimboom-Brees IM, Manautou JE. 2006. Coordinated expression of multidrug resistance-associated proteins (Mrps) in mouse liver during toxicant-induced injury. *Toxicol Sci* 89: 370-9.
- Aleksunes LM, Slitt AL, Maher JM, Augustine LM, Goedken MJ, Chan JY, Cherrington NJ, Klaassen CD, Manautou JE. 2008b. Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 226: 74-83.
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. 1998. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 58: 5337-9.
- Amicarelli, F., G.M. Tiboni, S. Colafarina, A. Bonfigli, E. Iammarrone, M. Miranda, and C. Di Ilio. 2000. Antioxidant and GSH-related enzyme response to a single teratogenic exposure to the anticonvulsant phenytoin: temporospatial evaluation. *Teratology.* 62:100-7.
- Amit, Y., and T. Brenner. 1993. Age-dependent sensitivity of cultured rat glial cells to bilirubin toxicity. *Exp Neurol.* 121:248-55.
- Ananthanarayanan, M., N. Balasubramanian, M. Makishima, D.J. Mangelsdorf, and F.J. Suchy. 2001. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem.* 276:28857-65.
- Arias, I.M., H. Popper, D. Schachter, and D.A. Shafritz. 1982. The liver. Biology and pathology. Raven Press, New York. 192-198.
- Atkinson DE, Greenwood SL, Sibley CP, Glazier JD, Fairbairn LJ. 2003. Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C584-91.
- Aziz, S., P. Kotal, P. Leroy, R. Servaes, E. Eggermont, and J. Fevery. 2001. Bilirubin-IXalpha and -IXbeta pigments, coproporphyrins and bile acids in meconium and stools from full-term and preterm neonates during the first month of life. *Acta Paediatr.* 90:81-7.
- Back, P., and K. Walter. 1980. Developmental pattern of bile acid metabolism as revealed by bile acid analysis of meconium. *Gastroenterology.* 78:671-6.
- Backe E, Schwarting R, Gerdes J, Ernst M, Stein H. 1991. Ber-MAC3: new monoclonal antibody that defines human monocyte/macrophage differentiation antigen. *J Clin Pathol* 44: 936-45.
- Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, Ross DD. 2001. Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim Biophys Acta* 1520: 234-41.

- Balistreri, W.F., A.K. HH, K.D. Setchell, D. Gremse, F.C. Ryckman, and T.J. Schroeder. 1992. New methods for assessing liver function in infants and children. *Ann Clin Lab Sci.* 22:162-74.
- Balla, G., H.S. Jacob, J. Balla, M. Rosenberg, K. Nath, F. Apple, J.W. Eaton, and G.M. Vercellotti. 1992. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* 267:18148-53.
- Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, Li N. 2005. OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 42: 1270-9.
- Ballatori, N. 2005. Biology of a novel organic solute and steroid transporter, OSTalpha-OSTbeta. *Exp Biol Med (Maywood)*. 230:689-98.
- Ballatori, N., W.V. Christian, J.Y. Lee, P.A. Dawson, C.J. Soroka, J.L. Boyer, M.S. Madejczyk, and N. Li. 2005. OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology.* 42:1270-9.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16093-8.
- Baranano, D.E., H. Wolosker, B.I. Bae, R.K. Barrow, S.H. Snyder, and C.D. Ferris. 2000. A mammalian iron ATPase induced by iron. *J Biol Chem.* 275:15166-73.
- Barnea, E.R. 1994. Modulatory effect of maternal serum on xenobiotic metabolizing activity of placental explants: modification by cigarette smoking. *Hum Reprod.* 9:1017-21.
- Barros, L.F., D.L. Yudilevich, S.M. Jarvis, N. Beaumont, J.D. Young, and S.A. Baldwin. 1995. Immunolocalisation of nucleoside transporters in human placental trophoblast and endothelial cells: evidence for multiple transporter isoforms. *Pflugers Arch.* 429:394-9.
- Bates, S.E., R. Robey, K. Miyake, K. Rao, D.D. Ross, and T. Litman. 2001. The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr.* 33:503-11.
- Baticón, D. 1999. Fisiología de la fecundación, embarazo, parto y lactancia. In *Fisiología Humana*. J.A.F. Tresguerres, editor. MacGraw-Hill-Interamericana, Madrid.
- Beaconsfield, P., G. Birdwood, and R. Beaconsfield. 1980. The placenta. *Sci Am.* 243:94-102.
- Behrman RE, K.R., Nelson WE and Vaughan III VC. 1992. In *Tratado de pediatría*. MacGraw-Hill-Interamericana, Madrid.
- Belinsky, M.G., Z.S. Chen, I. Shchaveleva, H. Zeng, and G.D. Kruh. 2002. Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res.* 62:6172-7.
- Benz, C., S. Angermuller, U. Tox, P. Kloters-Plachky, H.D. Riedel, P. Sauer, W. Stremmel, and A. Stiehl. 1998. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J Hepatol.* 28:99-106.
- Berge, K.E., H. Tian, G.A. Graf, L. Yu, N.V. Grishin, J. Schultz, P. Kwiterovich, B. Shan, R. Barnes, and H.H. Hobbs. 2000. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science.* 290:1771-5.
- Bergen, A.A., A.S. Plomp, X. Hu, P.T. de Jong, and T.G. Gorgels. 2007. ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum. *Pflugers Arch.* 453:685-91.
- Bervoets, K., J.S. Schlenzig, and H. Bohles. 1994. [Bilirubin in the early neonatal period. Is there a positive aspect of hyperbilirubinemia?--A medical hypothesis]. *Fortschr Med.* 112:192-4.

- Bjorkhem, I. 1992. Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *J Lipid Res.* 33:455-71.
- Blanckaert N. 1980. Analysis of bilirubin and bilirubin mono- and di-conjugates. Determination of their relative amounts in biological samples. *Biochem J* 185: 115-28.
- Blanckaert, N., K.P. Heirwegh, and Z. Zaman. 1977. Comparison of the biliary excretion of the four isomers of bilirubin-IX in Wistar and homozygous Gunn rats. *Biochem J.* 164:229-36.
- Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, Desoye G. 2000. Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta* 21: 733-41.
- Blumberg B, Evans RM. 1998. Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev* 12: 3149-55.
- Blumberg, B., and R.M. Evans. 1998. Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev.* 12:3149-55.
- Bond BC, Virley DJ, Cairns NJ, Hunter AJ, Moore GB, Moss SJ, Mudge AW, Walsh FS, Jazin E, Preece P. 2002. The quantification of gene expression in an animal model of brain ischaemia using TaqMan real-time RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* 106: 101-16.
- Borst, P., R. Evers, M. Kool, and J. Wijnholds. 1999. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta.* 1461:347-57.
- Borst, P., R. Evers, M. Kool, and J. Wijnholds. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 92:1295-302.
- Bosch, I., and J. Croop. 1996. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1288:F37-54.
- Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL. 1994. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 269: 17960-4.
- Bravo P, Bender V, Cassio D. 1998. Efficient in vitro vectorial transport of a fluorescent conjugated bile acid analogue by polarized hepatic hybrid WIF-B and WIF-B9 cells. *Hepatology* 27: 576-83.
- Bravo P, Marin JJ, Beveridge MJ, Novak DA. 1995. Reconstitution and characterization of ATP-dependent bile acid transport in human and rat placenta. *Biochem J* 311 (Pt 2): 479-85.
- Bravo, P., M.Y. el-Mir, M.A. Serrano, R. Boyd, and J.J. Marin. 1993. Interaction between cholephilic anions and bile acid transport across basal membrane of human trophoblast. *Am J Physiol.* 265:G242-50.
- Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnurch H, Gotsch U, Vestweber D, Risau W, Dejana E. 1996. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 87: 630-41.
- Bremer S, Hoof T, Wilke M, Busche R, Scholte B, Riordan JR, Maass G, Tummeler B. 1992. Quantitative expression patterns of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) and differentially spliced cystic-fibrosis transmembrane-conductance regulator mRNA transcripts in human epithelia. *Eur J Biochem* 206: 137-49.
- Breuzard G, Piot O, Angiboust JF, Manfait M, Candeil L, Del Rio M, Millot JM. 2005. Changes in adsorption and permeability of mitoxantrone on plasma membrane of BCRP/MXR resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 64-70.

- Briz O, el-Mir MY, Bravo P, Villanueva GR, Marin JJ. 1998. Fetal excretion of the fluorescent bile acid derivative cholyglycylamido-fluorescein (FITC-GC) by the rat placenta-maternal liver tandem. *Placenta* 19: 119-26.
- Briz O, Macias RI, Serrano MA, Gonzalez-Gallego J, Bayon JE, Marin JJ. 2003a. Excretion of foetal bilirubin by the rat placenta-maternal liver tandem. *Placenta* 24: 462-72.
- Briz O, Macias RI, Vallejo M, Silva A, Serrano MA, Marin JJ. 2003b. Usefulness of liposomes loaded with cytostatic bile acid derivatives to circumvent chemotherapy resistance of enterohepatic tumors. *Mol Pharmacol* 63: 742-50.
- Briz O, Romero MR, Martinez-Becerra P, Macias RI, Perez MJ, Jimenez F, San Martin FG, Marin JJ. 2006. OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes? *J Biol Chem* 281: 30326-35.
- Briz O, Serrano MA, Macias RI, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. 2003b. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J* 371: 897-905.
- Briz O, Serrano MA, Rebollo N, Hagenbuch B, Meier PJ, Koepsell H, Marin JJ. 2002. Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholyglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol* 61: 853-60.
- Bulmer AC, Ried K, Blanchfield JT, Wagner KH. 2008. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat Res* 658: 28-41.
- Burton, G.J., A.L. Watson, J. Hempstock, J.N. Skepper, and E. Jauniaux. 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:2954-9.
- Burton, G.J., and E. Jauniaux. 2001. Maternal vascularisation of the human placenta: does the embryo develop in a hypoxic environment? *Gynecol Obstet Fertil.* 29:503-8.
- Burton, G.J., and E. Jauniaux. 2004. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 11:342-52.
- Byrne, J.A., S.S. Strautnieks, G. Mieli-Vergani, C.F. Higgins, K.J. Linton, and R.J. Thompson. 2002. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology.* 123:1649-58.
- Cabral, D.J., D.M. Small, H.S. Lilly, and J.A. Hamilton. 1987. Transbilayer movement of bile acids in model membranes. *Biochemistry.* 26:1801-4.
- Cantz T, Nies AT, Brom M, Hofmann AF, Keppler D. 2000. MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G522-31.
- Cattori V, van Montfoort JE, Stieger B, Landmann L, Meijer DK, Winterhalter KH, Meier PJ, Hagenbuch B. 2001. Localization of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflugers Arch* 443: 188-95.
- Ceckova M, Libra A, Pavek P, Nachtigal P, Brabec M, Fuchs R, Staud F. 2006. Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 58-65.
- Ceckova-Novotna, M., P. Pavek, and F. Staud. 2006. P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol.* 22:400-10.

- Cerneus DP, van der Ende A. 1991. Apical and basolateral transferrin receptors in polarized BeWo cells recycle through separate endosomes. *J Cell Biol* 114: 1149-58.
- Chan, L.M., S. Lowes, and B.H. Hirst. 2004. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 21:25-51.
- Chappuy, H., J.M. Treluyer, V. Jullien, J. Dimet, E. Rey, M. Fouche, G. Firtion, G. Pons, and L. Mandelbrot. 2004. Maternal-fetal transfer and amniotic fluid accumulation of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors in human immunodeficiency virus-infected pregnant women. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:4332-6.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294: 1866-70.
- Chen ZS, Robey RW, Belinsky MG, Shchaveleva I, Ren XQ, Sugimoto Y, Ross DD, Bates SE, Kruh GD. 2003. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res* 63: 4048-54.
- Chen, Z.S., Y. Guo, M.G. Belinsky, E. Kotova, and G.D. Kruh. 2005. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol.* 67:545-57.
- Chignard, N., M. Mergey, D. Veissiere, R. Parc, J. Capeau, R. Poupon, A. Paul, and C. Housset. 2001. Bile acid transport and regulating functions in the human biliary epithelium. *Hepatology.* 33:496-503.
- Cleal, J.K., and R.M. Lewis. 2008. The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human fetus. *J Neuroendocrinol.* 20:419-26.
- Coan, P.M., A.C. Ferguson-Smith, and G.J. Burton. 2004. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod.* 70:1806-13.
- Colombo, C., A. Roda, E. Roda, M. Buscaglia, C.A. dell'Agnola, P. Filippetti, M. Ronchi, and F. Sereni. 1985. Correlation between fetal and maternal serum bile acid concentrations. *Pediatr Res.* 19:227-31.
- Colombo, C., G. Zuliani, M. Ronchi, J. Breidenstein, and K.D. Setchell. 1987. Biliary bile acid composition of the human fetus in early gestation. *Pediatr Res.* 21:197-200.
- Combettes, L., B. Berthon, and M. Claret. 1992. Taurolithocholate-induced Ca²⁺ release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem J.* 287 (Pt 3):891-6.
- Cordon-Cardo, C., J.P. O'Brien, J. Boccia, D. Casals, J.R. Bertino, and M.R. Melamed. 1990. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem.* 38:1277-87.
- Costa AM, Maximiano EB, Avvad-Portari E, Jesus NR, Levy RA, Porto LC. 2006. Contractile cells and fibrillin-1 distribution is disturbed in terminal villi of placentae from patients with preeclampsia and systemic lupus erythematosus. *Placenta* 27: 234-43.
- Craddock, A.L., M.W. Love, R.W. Daniel, L.C. Kirby, H.C. Walters, M.H. Wong, and P.A. Dawson. 1998. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol.* 274:G157-69.
- Cui Y, Konig J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. 2001. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem* 276: 9626-30.

- Cummins CL, Mangravite LM, Benet LZ. 2001. Characterizing the expression of CYP3A4 and efflux transporters (P-gp, MRP1, and MRP2) in CYP3A4-transfected Caco-2 cells after induction with sodium butyrate and the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Pharm Res* 18: 1102-9.
- Dalhoff K, Laursen H, Bangert K, Poulsen HE, Anderson ME, Grunnet N, Tygstrup N. 2001. Autoprotection in acetaminophen intoxication in rats: the role of liver regeneration. *Pharmacol Toxicol* 88: 135-41.
- Davie JR. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133: 2485S-2493S.
- Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV, Ballatori N. 2005. The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* 280: 6960-8.
- Daya D, Sabet L. 1991. The use of cytokeratin as a sensitive and reliable marker for trophoblastic tissue. *Am J Clin Pathol* 95: 137-41.
- Dean, M., and T. Annilo. 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 6:123-42.
- Deleze, G., G. Paumgartner, G. Karlaganis, W. Giger, M. Reinhard, and D. Sidiropoulos. 1978. Bile acid pattern in human amniotic fluid. *Eur J Clin Invest.* 8:41-5.
- Donner, M.G., and D. Keppler. 2001. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology.* 34:351-9.
- Dore, S., and S.H. Snyder. 1999. Neuroprotective action of bilirubin against oxidative stress in primary hippocampal cultures. *Ann N Y Acad Sci.* 890:167-72.
- Dore, S., K. Sampei, S. Goto, N.J. Alkayed, D. Guastella, S. Blackshaw, M. Gallagher, R.J. Traystman, P.D. Hurn, R.C. Koehler, and S.H. Snyder. 1999a. Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. *Mol Med.* 5:656-63.
- Dore, S., M. Takahashi, C.D. Ferris, R. Zakhary, L.D. Hester, D. Guastella, and S.H. Snyder. 1999b. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2445-50.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15665-70.
- Durand RE. 1982. Use of Hoechst 33342 for cell selection from multicell systems. *J Histochem Cytochem* 30: 117-22.
- Dye JF, Jablenska R, Donnelly JL, Lawrence L, Leach L, Clark P, Firth JA. 2001. Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta* 22: 32-43.
- Ellinger I, Schwab M, Stefanescu A, Hunziker W, Fuchs R. 1999. IgG transport across trophoblast-derived BeWo cells: a model system to study IgG transport in the placenta. *Eur J Immunol* 29: 733-44.
- El-Mir, M.Y., M.J. Monte, A.I. Morales, M. Arevalo, M.A. Serrano, and J.J. Marin. 1997. Effect of maternal cholestasis on biliary lipid and bile acid secretion in the infant rat. *Hepatology.* 26:527-36.
- el-Mir, M.Y., N. Eleno, M.A. Serrano, P. Bravo, and J.J. Marin. 1991. Bicarbonate-induced activation of taurocholate transport across the basal plasma membrane of human term trophoblast. *Am J Physiol.* 260:G887-94.

- Eloranta, J.J., and G.A. Kullak-Ublick. 2005. Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 433:397-412.
- Erlinger, S. 1996. Review article: new insights into the mechanisms of hepatic transport and bile secretion. *J Gastroenterol Hepatol*. 11:575-9.
- Evans, W.H. 1980. A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim Biophys Acta*. 604:27-64.
- Evseenko DA, Murthi P, Paxton JW, Reid G, Emerald BS, Mohankumar KM, Lobie PE, Brennecke SP, Kalionis B, Keelan JA. 2007a. The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction. *FASEB J* 21: 3592-605.
- Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA. 2006. ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1357-65.
- Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA. 2007b. The xenobiotic transporter ABCG2 plays a novel role in differentiation of trophoblast-like BeWo cells. *Placenta* 28 Suppl A: S116-20.
- Fautz R, Husein B, Efsthathiou E, Hechenberger-Freudl C. 1993. Assessment of the relation between the initial viability and the attachment of freshly isolated rat hepatocytes used for the in vivo/in vitro DNA repair assay (UDS). *Mutat Res* 291: 21-7.
- Fayard, E., K. Schoonjans, and J. Auwerx. 2001. Xol INXS: role of the liver X and the farnesol X receptors. *Curr Opin Lipidol*. 12:113-20.
- Ferris, C.D., S.R. Jaffrey, A. Sawa, M. Takahashi, S.D. Brady, R.K. Barrow, S.A. Tysoe, H. Wolosker, D.E. Baranano, S. Dore, K.D. Poss, and S.H. Snyder. 1999. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol*. 1:152-7.
- Foresti, R., P. Sarathchandra, J.E. Clark, C.J. Green, and R. Motterlini. 1999. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J*. 339 (Pt 3):729-36.
- Friesema, E.C., R. Docter, E.P. Moerings, B. Stieger, B. Hagenbuch, P.J. Meier, E.P. Krenning, G. Hennemann, and T.J. Visser. 1999. Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun*. 254:497-501.
- Frohling, W., and A. Stiehl. 1976. Bile salt glucuronides: identification and quantitative analysis in the urine of patients with cholestasis. *Eur J Clin Invest*. 6:67-74.
- Fromm, M.F. 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci*. 25:423-9.
- Fujiwara, K., H. Adachi, T. Nishio, M. Unno, T. Tokui, M. Okabe, T. Onogawa, T. Suzuki, N. Asano, M. Tanemoto, M. Seki, K. Shiiba, M. Suzuki, Y. Kondo, K. Nunoki, T. Shimosegawa, K. Iinuma, S. Ito, S. Matsuno, and T. Abe. 2001. Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology*. 142:2005-12.
- Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27: 549-50.
- Galbraith, R. 1999. Heme oxygenase: who needs it? *Proc Soc Exp Biol Med*. 222:299-305.
- Ganapathy, M.E., W. Huang, D.P. Rajan, A.L. Carter, M. Sugawara, K. Iseki, F.H. Leibach, and V. Ganapathy. 2000a. beta-lactam antibiotics as substrates for OCTN2, an organic cation/carnitine transporter. *J Biol Chem*. 275:1699-707.

- Ganapathy, V., and P.D. Prasad. 2005. Role of transporters in placental transfer of drugs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 207:381-7.
- Ganapathy, V., P.D. Prasad, M.E. Ganapathy, and F.H. Leibach. 2000b. Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. *J Pharmacol Exp Ther.* 294:413-20.
- Ganapathy, V.V., P.D. Prasad, M.E. Ganapathy, and F.H. Leibach. 1999. Drugs of abuse and placental transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 38:99-110.
- Gao, B., B. Stieger, B. Noe, J.M. Fritschy, and P.J. Meier. 1999. Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J Histochem Cytochem.* 47:1255-64.
- Gatmaitan, Z.C., and I.M. Arias. 1993. Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Adv Pharmacol.* 24:77-97.
- Gatmaitan, Z.C., and I.M. Arias. 1995. ATP-dependent transport systems in the canalicular membrane of the hepatocyte. *Physiol Rev.* 75:261-75.
- Gedeon C, Anger G, Piquette-Miller M, Koren G. 2008. Breast cancer resistance protein: mediating the trans-placental transfer of glyburide across the human placenta. *Placenta* 29: 39-43.
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. 1998. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273: 10046-50.
- Geyer J, Doring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E. 2007. Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 282: 19728-41.
- Geyer J, Wilke T, Petzinger E. 2006. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372: 413-31.
- Ghanem CI, Ruiz ML, Villanueva SS, Luquita M, Llesuy S, Catania VA, Bengochea LA, Mottino AD. 2009. Effect of repeated administration with subtoxic doses of acetaminophen to rats on enterohepatic recirculation of a subsequent toxic dose. *Biochem Pharmacol* 77: 1621-8.
- Giri N, Agarwal S, Shaik N, Pan G, Chen Y, Elmquist WF. 2009. Substrate-dependent breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2)-mediated interactions: consideration of multiple binding sites in in vitro assay design. *Drug Metab Dispos* 37: 560-70.
- Glantz, A., H.U. Marschall, and L.A. Mattsson. 2004. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology.* 40:467-74.
- Goldstein, L.J. 1996. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer.* 32A:1039-50.
- Goldstein, L.J., M.M. Gottesman, and I. Pastan. 1991. Expression of the MDR1 gene in human cancers. *Cancer Treat Res.* 57:101-19.
- Gourley GR. 1997. Bilirubin metabolism and kernicterus. *Adv Pediatr* 44: 173-229.
- Graf R, Langer JU, Schonfelder G, Oney T, Hartel-Schenk S, Reutter W, Schmidt HH. 1994. The extravascular contractile system in the human placenta. Morphological and immunocytochemical investigations. *Anat Embryol (Berl)* 190: 541-8.

Graf R, Matejevic D, Schuppan D, Neudeck H, Shakibaei M, Vetter K. 1997. Molecular anatomy of the perivascular sheath in human placental stem villi: the contractile apparatus and its association to the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 290: 601-7.

Griffiths, M., N. Beaumont, S.Y. Yao, M. Sundaram, C.E. Boumah, A. Davies, F.Y. Kwong, I. Coe, C.E. Cass, J.D. Young, and S.A. Baldwin. 1997a. Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med*. 3:89-93.

Griffiths, M., S.Y. Yao, F. Abidi, S.E. Phillips, C.E. Cass, J.D. Young, and S.A. Baldwin. 1997b. Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J*. 328 (Pt 3):739-43.

Grillo, M.A., A. Lanza, and S. Colombatto. 2008. Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids*. 34:517-23.

Grube M, Reuther S, Meyer Zu Schwabedissen H, Kock K, Draber K, Ritter CA, Fusch C, Jedlitschky G, Kroemer HK. 2007. Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug Metab Dispos* 35: 30-5.

Grube, M., H.M. Schwabedissen, K. Draber, D. Prager, K.U. Moritz, K. Linnemann, C. Fusch, G. Jedlitschky, and H.K. Kroemer. 2005. Expression, localization, and function of the carnitine transporter octn2 (slc22a5) in human placenta. *Drug Metab Dispos*. 33:31-7.

Grube, M., S. Reuther, H. Meyer Zu Schwabedissen, K. Kock, K. Draber, C.A. Ritter, C. Fusch, G. Jedlitschky, and H.K. Kroemer. 2007. Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug Metab Dispos*. 35:30-5.

Gumucio, J.J. 1983. Functional and anatomic heterogeneity in the liver acinus: impact on transport. *Am J Physiol*. 244:G578-82.

Guo, Y., E. Kotova, Z.S. Chen, K. Lee, E. Hopper-Borge, M.G. Belinsky, and G.D. Kruh. 2003. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem*. 278:29509-14.

Gutman I, Bergmeyer U. 1974. Determination of urea with glutamate dehydrogenase as indicator enzyme. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer U, editor. Verlag Chemie, Academic Press, New York (USA).

Hagenbuch B, Meier PJ. 1994. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93: 1326-31.

Hagenbuch B, Meier PJ. 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447: 653-65.

Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H, Meier PJ. 1991. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10629-33.

Hagenbuch, B., and C. Gui. 2008. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*. 38:778-801.

Hagenbuch, B., and P.J. Meier. 1996. Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis*. 16:129-36.

- Haigh T, Chen C, Jones CJ, Aplin JD. 1999. Studies of mesenchymal cells from 1st trimester human placenta: expression of cytokeratin outside the trophoblast lineage. *Placenta* 20: 615-25.
- Halestrap, A.P., and D. Meredith. 2004. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 447:619-28.
- Halestrap, A.P., and N.T. Price. 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J.* 343 Pt 2:281-99.
- Himes JA, Cornelius CE. 1975. Biliverdin and bilirubin excretion in the turkey. *Cornell Vet* 65: 374-9.
- Hofmann, A.F. 1994. Intestinal absorption of bile acids and biliary constituents. In *The intestinal component of the enterohepatic circulation and the integrated system*. L.R. Johnson, editor. Raven Press, New York. 1845-1865.
- Homolya L, Varadi A, Sarkadi B. 2003. Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* 17: 103-14.
- Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Perez WY, Robey RW, van de Laar A, Litman T, Dean M, Bates SE. 2001. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* 61: 6635-9.
- Hopper-Borge, E., Z.S. Chen, I. Shchaveleva, M.G. Belinsky, and G.D. Kruh. 2004. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res.* 64:4927-30.
- Houten, S.M., M. Watanabe, and J. Auwerx. 2006. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J.* 25:1419-25.
- Huang TJ, Trakshel GM, Maines MD. 1989. Detection of 10 variants of biliverdin reductase in rat liver by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 264: 7844-9.
- Ikemoto, S., M. Takahashi, N. Tsunoda, K. Maruyama, H. Itakura, K. Kawanaka, I. Tabata, M. Higuchi, T. Tange, T.T. Yamamoto, and O. Ezaki. 1997. Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease. *Am J Physiol.* 273:E37-45.
- Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. 2003. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol* 64: 610-8.
- Imai Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. 2002. Estrone and 17beta-estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance. *Jpn J Cancer Res* 93: 231-5.
- Iwasaki H, Isayama T, Ichiki T, Kikuchi M. 1987. Intermediate filaments of myofibroblasts. Immunochemical and immunocytochemical analyses. *Pathol Res Pract* 182: 248-54.
- Izukura, M., T. Hashimoto, G. Gomez, T. Uchida, G.H. Greeley, Jr., and J.C. Thompson. 1991. Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystokinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Pancreas.* 6:427-32.
- Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. 1994. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 133-7.
- Janvilisri T, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L, van Veen HW. 2005. Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem J* 385: 419-26.

- Jauniaux, E., A.L. Watson, J. Hempstock, Y.P. Bao, J.N. Skepper, and G.J. Burton. 2000. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 157:2111-22.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. 1996. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* 56: 988-94.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D. 1997. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J* 327 (Pt 1): 305-10.
- Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, Schinkel AH. 2000. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst* 92: 1651-6.
- Juliano, R. 1976. Drug-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells possess an altered cell surface carbohydrate component. *J Supramol Struct.* 4:521-6.
- Kalabis, G.M., S. Petropoulos, W. Gibb, and S.G. Matthews. 2007. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) in mouse placenta and yolk sac: ontogeny and its regulation by progesterone. *Placenta.* 28:1073-81.
- Karpen SJ. 2002. Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol* 36: 832-50.
- Kartenbeck, J., U. Leuschner, R. Mayer, and D. Keppler. 1996. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 23:1061-6.
- Kaufmann, P., U. Bruns, R. Leiser, M. Luckhardt, and E. Winterhager. 1985. The fetal vascularisation of term human placental villi. II. Intermediate and terminal villi. *Anat Embryol (Berl).* 173:203-14.
- Kawade N, Onishi S. 1981. The prenatal and postnatal development of UDP-glucuronyltransferase activity towards bilirubin and the effect of premature birth on this activity in the human liver. *Biochem J* 196: 257-60.
- Kawamata, Y., R. Fujii, M. Hosoya, M. Harada, H. Yoshida, M. Miwa, S. Fukusumi, Y. Habata, T. Itoh, Y. Shintani, S. Hinuma, Y. Fujisawa, and M. Fujino. 2003. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem.* 278:9435-40.
- Keitel, V., R. Kubitz, and D. Haussinger. 2008. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol.* 14:5620-9.
- Kekuda, R., P.D. Prasad, X. Wu, H. Wang, Y.J. Fei, F.H. Leibach, and V. Ganapathy. 1998. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem.* 273:15971-9.
- Keppler D, Konig J, Buchler M. 1997. The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Adv Enzyme Regul* 37: 321-33.
- Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, Mayer R, Buchler M. 1996. The function of the multidrug resistance proteins (MRP and cMRP) in drug conjugate transport and hepatobiliary excretion. *Adv Enzyme Regul* 36: 17-29.
- Keppler, D., J. Konig, and M. Buchler. 1997. The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Adv Enzyme Regul.* 37:321-33.

- Keppler, D., T. Kamisako, I. Leier, Y. Cui, A.T. Nies, H. Tsujii, and J. König. 2000. Localization, substrate specificity, and drug resistance conferred by conjugate export pumps of the MRP family. *Adv Enzyme Regul.* 40:339-49.
- Keyse, S.M., and R.M. Tyrrell. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:99-103.
- Kimura, A., R. Mahara, M. Tohma, K. Ushijima, K. Yuge, E. Ono, and F. Yamashita. 1989. Unusual 1 beta-hydroxylated bile acids in children with a paucity in interlobular bile ducts. *Clin Chim Acta.* 185:215-7.
- Kishi M, Emi Y, Sakaguchi M, Ikushiro S, Iyanagi T. 2008. Ontogenic isoform switching of UDP-glucuronosyltransferase family 1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 815-9.
- Kishi, M., Y. Emi, M. Sakaguchi, S. Ikushiro, and T. Iyanagi. 2008. Ontogenic isoform switching of UDP-glucuronosyltransferase family 1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 377:815-9.
- Kitamura T, Gatmaitan Z, Arias IM. 1990. Serial quantitative image analysis and confocal microscopy of hepatic uptake, intracellular distribution and biliary secretion of a fluorescent bile acid analog in rat hepatocyte doublets. *Hepatology* 12: 1358-64.
- Klaassen CD. 1974. Bile flow and composition during bile acid depletion and administration. *Can J Physiol Pharmacol* 52: 334-48.
- Kliwer SA, Lehmann JM, Willson TM. 1999. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284: 757-60.
- Knudsen A, Lebech M. 1989. Maternal bilirubin, cord bilirubin, and placenta function at delivery and the development of jaundice in mature newborns. *Acta Obstet Gynecol Scand* 68: 719-24.
- Knudsen, A., and M. Lebech. 1989. Maternal bilirubin, cord bilirubin, and placenta function at delivery and the development of jaundice in mature newborns. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 68:719-24.
- Kobayashi Y, Shibusawa A, Saito H, Ohshiro N, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T. 2005. Isolation and functional characterization of a novel organic solute carrier protein, hOSCP1. *J Biol Chem* 280: 32332-9.
- Kobayashi Y, Tsuchiya A, Hayashi T, Kohyama N, Ohbayashi M, Yamamoto T. 2007. Isolation and characterization of polyspecific mouse organic solute carrier protein 1 (mOscp1). *Drug Metab Dispos* 35: 1239-45.
- Kohnen G, Kertschanska S, Demir R, Kaufmann P. 1996. Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol* 105: 415-29.
- Kolwankar D, Glover DD, Ware JA, Tracy TS. 2005. Expression and function of ABCB1 and ABCG2 in human placental tissue. *Drug Metab Dispos* 33: 524-9.
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. 1999. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461: 377-94.
- König, J., Y. Cui, A.T. Nies, and D. Keppler. 2000. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278:G156-64.

- Kramer, W., F. Girbig, H. Glombik, D. Corsiero, S. Stengelin, and C. Weyland. 2001. Identification of a ligand-binding site in the Na⁺/bile acid cotransporting protein from rabbit ileum. *J Biol Chem*. 276:36020-7.
- Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. 2004. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 279: 24218-25.
- Krishnamurthy P, Schuetz JD. 2006. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 381-410.
- Kukongviriyapan V, Stacey NH. 1989. Comparison of uptake kinetics in freshly isolated suspensions and short-term primary cultures of rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 140: 491-7.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B. 2001. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120: 525-33.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ. 2000. Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 20: 273-92.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. 2004. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126: 322-42.
- Kullak-Ublick GA. 2003. ABC transporter regulation by bile acids: where PXR meets FXR. *J Hepatol* 39: 628-30.
- Kullak-Ublick, G.A., B. Hagenbuch, B. Stieger, C.D. Schteingart, A.F. Hofmann, A.W. Wolkoff, and P.J. Meier. 1995. Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology*. 109:1274-82.
- Kullak-Ublick, G.A., J. Glasa, C. Boker, M. Oswald, U. Grutzner, B. Hagenbuch, B. Stieger, P.J. Meier, U. Beuers, W. Kramer, G. Wess, and G. Paumgartner. 1997. Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology*. 113:1295-305.
- Kullak-Ublick, G.A., M.G. Ismail, B. Stieger, L. Landmann, R. Huber, F. Pizzagalli, K. Fattinger, P.J. Meier, and B. Hagenbuch. 2001. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*. 120:525-33.
- Kusuhara, H., and Y. Sugiyama. 2007. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch*. 453:735-44.
- Kwak, J.Y., K. Takeshige, B.S. Cheung, and S. Minakami. 1991. Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim Biophys Acta*. 1076:369-73.
- Lammert, F., H.U. Marschall, and S. Matern. 2003. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 6:123-132.
- Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118: 1511-22.
- Lazaridis, K.N., L. Pham, P. Tietz, R.A. Marinelli, P.C. deGroen, S. Levine, P.A. Dawson, and N.F. LaRusso. 1997. Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest*. 100:2714-21.

- Leach L, Clark P, Lampugnani MG, Arroyo AG, Dejana E, Firth JA. 1993. Immunoelectron characterisation of the inter-endothelial junctions of human term placenta. *J Cell Sci* 104 (Pt 4): 1073-81.
- Leazer, T.M., and C.D. Klaassen. 2003. The presence of xenobiotic transporters in rat placenta. *Drug Metab Dispos.* 31:153-67.
- Lecureur, V., D. Sun, P. Hargrove, E.G. Schuetz, R.B. Kim, L.B. Lan, and J.D. Schuetz. 2000. Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol Pharmacol.* 57:24-35.
- Lee WM. 2004. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 40: 6-9.
- Lee-Huang, S., J.J. Lin, H.F. Kung, P.L. Huan, L. Lee, and P.L. Huang. 1993. The 3' flanking region of the human erythropoietin-encoding gene contains nitrogen-regulatory/oxygen-sensing consensus sequences and tissue-specific transcriptional regulatory elements. *Gene.* 137:203-10.
- Lester, R. 1983. Introduction. Bile acid metabolism in the newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2:335-6.
- Lew JL, Zhao A, Yu J, Huang L, De Pedro N, Pelaez F, Wright SD, Cui J. 2004. The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *J Biol Chem* 279: 8856-61.
- Li, L., P.J. Meier, and N. Ballatori. 2000. Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol.* 58:335-40.
- Li, L., T.K. Lee, P.J. Meier, and N. Ballatori. 1998. Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem.* 273:16184-91.
- Lin GL, Himes JA, Cornelius CE. 1974. Bilirubin and biliverdin excretion by the chicken. *Am J Physiol* 226: 881-5.
- Litman T, Jensen U, Hansen A, Covitz KM, Zhan Z, Fetsch P, Abati A, Hansen PR, Horn T, Skovsgaard T, Bates SE. 2002. Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochim Biophys Acta* 1565: 6-16.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.
- Luckett, W.P. 1975. The development of primordial and definitive amniotic cavities in early Rhesus monkey and human embryos. *Am J Anat.* 144:149-67.
- Macias RI, Pascual MJ, Bravo A, Alcalde MP, Larena MG, St-Pierre MV, Serrano MA, Marin JJ. 2000. Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology* 31: 975-83.
- Macias, R.I., S. Jimenez, M.A. Serrano, M.J. Monte, and J.J. Marin. 2006. Effect of maternal cholestasis and treatment with ursodeoxycholic acid on the expression of genes involved in the secretion of biliary lipids by the neonatal rat liver. *Life Sci.* 79:1014-9.
- Madon, J., B. Hagenbuch, L. Landmann, P.J. Meier, and B. Stieger. 2000. Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol.* 57:634-41.

- Mahagita, C., S.M. Grassl, P. Piyachaturawat, and N. Ballatori. 2007. Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293:G271-8.
- Maines, M.D. 1988. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*. 2:2557-68.
- Maines, M.D. 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37:517-54.
- Maines, M.D., R.D. Mayer, J.F. Ewing, and W.K. McCoubrey, Jr. 1993. Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. *J Pharmacol Exp Ther*. 264:457-62.
- Makino I, Hashimoto H, Shinozaki K, Yoshino K, Nakagawa S. 1975. Sulfated and nonsulfated bile acids in urine, serum, and bile of patients with hepatobiliary diseases. *Gastroenterology* 68: 545-53.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. 1999. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284: 1362-5.
- Maldonado-Estrada J, Menu E, Roques P, Barre-Sinoussi F, Chaouat G. 2004. Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. *J Immunol Methods* 286: 21-34.
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61: 3458-64.
- Malloy HT, Evelyn KA. 1937. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *Journal of Biological Chemistry* 119: 481-490.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-9.
- Mao Q. 2008. BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharm Res* 25: 1244-55.
- Marin JJ, Bravo P, el-Mir MY, Serrano MA. 1995. ATP-dependent bile acid transport across microvillous membrane of human term trophoblast. *Am J Physiol* 268: G685-94.
- Marin JJ, Briz O, Serrano MA. 2004. A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs. *Curr Drug Deliv* 1: 275-89.
- Marin JJ, Macias RI, Serrano MA. 2003. The hepatobiliary-like excretory function of the placenta. A review. *Placenta* 24: 431-8.
- Marin JJ, Serrano MA, el-Mir MY, Eleno N, Boyd CA. 1990. Bile acid transport by basal membrane vesicles of human term placental trophoblast. *Gastroenterology* 99: 1431-8.
- Marin, J.J., E.R. Barbero, M.C. Herrera, A. Tabernero, and M.J. Monte. 1993. Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology*. 18:1182-92.
- Marin, J.J., O. Briz, M.J. Perez, M.R. Romero, and M.J. Monte. 2009. Hepatobiliary transporters in the pharmacology and toxicology of anticancer drugs. *Front Biosci*. 14:4257-80.

Marin, J.J., R.I. Macias, O. Briz, M.J. Perez, A.G. Blazquez, M. Arrese, and M.A. Serrano. 2008. Molecular bases of the fetal liver-placenta-maternal liver excretory pathway for cholephilic compounds. *Liver Int.* 28:435-54.

Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87: 206-10.

Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. 1995. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 5: 69-84.

Matheny, C.J., M.W. Lamb, K.R. Brouwer, and G.M. Pollack. 2001. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy*. 21:778-96.

McCoubrey WK, Jr., Cooklis MA, Maines MD. 1995. The structure, organization and differential expression of the rat gene encoding biliverdin reductase. *Gene* 160: 235-40.

McCoubrey, W.K., Jr., T.J. Huang, and M.D. Maines. 1997. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem.* 247:725-32.

McDonagh AF, Palma LA, Schmid R. 1981. Reduction of biliverdin and placental transfer of bilirubin and biliverdin in the pregnant guinea pig. *Biochem J* 194: 273-82.

McDonagh AF. 2001. Turning green to gold. *Nat Struct Biol* 8: 198-200.

McLaughlin, B.E., G.E. Lash, G.N. Smith, G.S. Marks, K. Nakatsu, C.H. Graham, and J.F. Brien. 2003. Heme oxygenase expression in selected regions of term human placenta. *Exp Biol Med (Maywood)*. 228:564-7.

McLean, M., M. Bowman, V. Clifton, R. Smith, and A.B. Grossman. 2000. Expression of the heme oxygenase-carbon monoxide signalling system in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:2345-9.

Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ, Pangalos MN. 2000. The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* 98: 9-20.

Meier PJ, Stieger B. 2002. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64: 635-61.

Meier, P.J. 1988. Transport polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis.* 8:293-307.

Meier, P.J. 1989. The bile salt secretory polarity of hepatocytes. *J Hepatol.* 9:124-9.

Meier, P.J., and B. Stieger. 2002. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol.* 64:635-61.

Meier, P.J., U. Eckhardt, A. Schroeder, B. Hagenbuch, and B. Stieger. 1997. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology.* 26:1667-77.

Meyer zu Schwabedissen HE, Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C, Cascorbi I, Kroemer HK. 2005. Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. *Drug Metab Dispos* 33: 896-904.

Meyer Zu Schwabedissen, H.E., M. Grube, B. Heydrich, K. Linnemann, C. Fusch, H.K. Kroemer, and G. Jedlitschky. 2005. Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation. *Am J Pathol.* 166:39-48.

Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y. 2006. Inhibition of bile acid transport across Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump

(ABCB 11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos* 34: 1575-81.

Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 211-7.

Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. 1999. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 59: 8-13.

Moll, W. 1985. Physiological aspects of placental ontogeny and phylogeny. *Placenta*. 6:141-54.

Momose T, Tsubaki T, Iida T, Nambara T. 1997. An improved synthesis of taurine- and glycine-conjugated bile acids. *Lipids* 32: 775-8.

Monte MJ, Rodriguez-Bravo T, Macias RI, Bravo P, el-Mir MY, Serrano MA, Lopez-Salva A, Marin JJ. 1995. Relationship between bile acid transplacental gradients and transport across the fetal-facing plasma membrane of the human trophoblast. *Pediatr Res* 38: 156-63.

Morikawa A, Goto Y, Suzuki H, Hirohashi T, Sugiyama Y. 2000. Biliary excretion of 17beta-estradiol 17beta-D-glucuronide is predominantly mediated by cMOAT/MRP2. *Pharm Res* 17: 546-52.

Mouro I, Halleck MS, Schlegel RA, Mattei MG, Williamson P, Zachowski A, Devaux P, Cartron JP, Colin Y. 1999. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ATPase II gene, member of the third subfamily of P-type ATPases and orthologous to the presumed bovine and murine aminophospholipid translocase. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 333-9.

Mouro, I., M.S. Halleck, R.A. Schlegel, M.G. Mattei, P. Williamson, A. Zachowski, P. Devaux, J.P. Cartron, and Y. Colin. 1999. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ATPase II gene, member of the third subfamily of P-type ATPases and orthologous to the presumed bovine and murine aminophospholipid translocase. *Biochem Biophys Res Commun*. 257:333-9.

Muhlhauser J, Crescimanno C, Kasper M, Zaccheo D, Castellucci M. 1995. Differentiation of human trophoblast populations involves alterations in cytokeratin patterns. *J Histochem Cytochem* 43: 579-89.

Muller, M., R. Mayer, U. Hero, and D. Keppler. 1994. ATP-dependent transport of amphiphilic cations across the hepatocyte canalicular membrane mediated by mdr1 P-glycoprotein. *FEBS Lett*. 343:168-72.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.

Munoz ME, Gonzalez J, Esteller A. 1986. Bile pigment formation and excretion in the rabbit. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 85: 67-71.

Munro, H.N. 1980. Placenta in relation to nutrition. Introduction. *Fed Proc*. 39:236-8.

Myllynen, P., M. Pasanen, and O. Pelkonen. 2005. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta*. 26:361-71.

Nagano M, Kuroki S, Mizuta A, Furukawa M, Noshiro M, Chijiwa K, Tanaka M. 2004. Regulation of bile acid synthesis under reconstructed enterohepatic circulation in rats. *Steroids* 69: 701-9.

Nagashige M, Ushigome F, Koyabu N, Hirata K, Kawabuchi M, Hirakawa T, Satoh S, Tsukimori K, Nakano H, Uchiumi T, Kuwano M, Ohtani H, Sawada Y. 2003. Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. *Placenta* 24: 951-8.

- Nakagawa M, Setchell KD. 1990. Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res* 31: 1089-98.
- Nakamura Y, Ikeda S, Furukawa T, Sumizawa T, Tani A, Akiyama S, Nagata Y. 1997. Function of P-glycoprotein expressed in placenta and mole. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 849-53.
- Nakanishi T, Doyle LA, Hassel B, Wei Y, Bauer KS, Wu S, Pumpilin DW, Fang HB, Ross DD. 2003. Functional characterization of human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) expressed in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Mol Pharmacol* 64: 1452-62.
- Nies AT, Cantz T, Brom M, Leier I, Keppler D. 1998. Expression of the apical conjugate export pump, Mrp2, in the polarized hepatoma cell line, WIF-B. *Hepatology* 28: 1332-40.
- Nies, A.T., and D. Keppler. 2007. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch.* 453:643-59.
- Nishio T, Adachi H, Nakagomi R, Tokui T, Sato E, Tanemoto M, Fujiwara K, Okabe M, Onogawa T, Suzuki T, Nakai D, Shiiba K, Suzuki M, Ohtani H, Kondo Y, Unno M, Ito S, Iinuma K, Nunoki K, Matsuno S, Abe T. 2000. Molecular identification of a rat novel organic anion transporter moat1, which transports prostaglandin D(2), leukotriene C(4), and taurocholate. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 831-8.
- Notter, M.F., M. Gupta, and D.M. Gash. 1986. Neuronal properties of monkey adrenal medulla in vitro. *Cell Tissue Res.* 244:69-76.
- Ogawa, K., H. Suzuki, T. Hirohashi, T. Ishikawa, P.J. Meier, K. Hirose, T. Akizawa, M. Yoshioka, and Y. Sugiyama. 2000. Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278:G438-46.
- Ohashi, R., I. Tamai, H. Yabuuchi, J.I. Nezu, A. Oku, Y. Sai, M. Shimane, and A. Tsuji. 1999. Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J Pharmacol Exp Ther.* 291:778-84.
- Ostrow JD, Mukerjee P, Tiribelli C. 1994. Structure and binding of unconjugated bilirubin: relevance for physiological and pathophysiological function. *J Lipid Res* 35: 1715-37.
- Paakki, P., H. Stockmann, M. Kantola, P. Wagner, U. Lauper, R. Huch, E. Elovaara, P. Kirkinen, and M. Pasanen. 2000. Maternal drug abuse and human term placental xenobiotic and steroid metabolizing enzymes in vitro. *Environ Health Perspect.* 108:141-5.
- Pacifici, G.M. 2006. Placental transfer of antibiotics administered to the mother: a review. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 44:57-63.
- Pacifici, G.M., and R. Nottoli. 1995. Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin Pharmacokinet.* 28:235-69.
- Parks, D.J., S.G. Blanchard, R.K. Bledsoe, G. Chandra, T.G. Consler, S.A. Kliewer, J.B. Stimmel, T.M. Willson, A.M. Zavacki, D.D. Moore, and J.M. Lehmann. 1999. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science.* 284:1365-8.
- Pasanen M. 1999. The expression and regulation of drug metabolism in human placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 38: 81-97.
- Pascolo L, Ferneti C, Garcia-Mediavilla MV, Ostrow JD, Tiribelli C. 2001. Mechanisms for the transport of unconjugated bilirubin in human trophoblastic BeWo cells. *FEBS Lett* 495: 94-9.

Pascolo L, Ferneti C, Pirulli D, Crovella S, Amoroso A, Tiribelli C. 2003. Effects of maturation on RNA transcription and protein expression of four MRP genes in human placenta and in BeWo cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 259-65.

Pascual MJ, Serrano MA, El-Mir MY, Macias RI, Jimenez F, Marin JJ. 2002. Relationship between asymptomatic hypercholanemia of pregnancy and progesterone metabolism. *Clin Sci (Lond)* 102: 587-93.

Pastrakuljic, A., L.O. Derewlany, and G. Koren. 1999. Maternal cocaine use and cigarette smoking in pregnancy in relation to amino acid transport and fetal growth. *Placenta*. 20:499-512.

Patel P, Weerasekera N, Hitchins M, Boyd CA, Johnston DG, Williamson C. 2003. Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta* 24: 39-44.

Patel, P., N. Weerasekera, M. Hitchins, C.A. Boyd, D.G. Johnston, and C. Williamson. 2003. Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta*. 24:39-44.

Pattillo RA, Gey GO. 1968. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Res* 28: 1231-6.

Perez MJ, Castano B, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. 2007. Multiple protective effects of melatonin against maternal cholestasis-induced oxidative stress and apoptosis in the rat fetal liver-placenta-maternal liver trio. *J Pineal Res* 43: 130-9.

Perez MJ, Castano B, Jimenez S, Serrano MA, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. 2008. Role of vitamin C transporters and biliverdin reductase in the dual pro-oxidant and anti-oxidant effect of biliary compounds on the placental-fetal unit in cholestasis during pregnancy. *Toxicol Appl Pharmacol* 232: 327-36.

Perez MJ, Macias RI, Duran C, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. 2005. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 43: 324-32.

Perez MJ, Macias RI, Marin JJ. 2006. Maternal cholestasis induces placental oxidative stress and apoptosis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *Placenta* 27: 34-41.

Pollex E, Lubetsky A, Koren G. 2008. The role of placental breast cancer resistance protein in the efflux of glyburide across the human placenta. *Placenta* 29: 743-7.

Qiao, L., S.I. Han, Y. Fang, J.S. Park, S. Gupta, D. Gilfor, G. Amorino, K. Valerie, L. Sealy, J.F. Engelhardt, S. Grant, P.B. Hylemon, and P. Dent. 2003. Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol*. 23:3052-66.

Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM. 2000. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 60: 47-50.

Ramonas LM, McDonagh AF, Palma LA. 1981. A flow-cell method for measuring hepatic excretion of pigments continuously in rats. *J Pharmacol Methods* 5: 149-64.

Rappaport, A.M. 1973. The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res*. 6:212-28.

Regev R, Yeheskely-Hayon D, Katzir H, Eytan GD. 2005. Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochem Pharmacol* 70: 161-9.

- Reichel C, Gao B, Van Montfoort J, Cattori V, Rahner C, Hagenbuch B, Stieger B, Kamisako T, Meier PJ. 1999. Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* 117: 688-95.
- Reynoso, E.E., F.A. Shepherd, H.A. Messner, H.A. Farquharson, M.B. Garvey, and M.A. Baker. 1987. Acute leukemia during pregnancy: the Toronto Leukemia Study Group experience with long-term follow-up of children exposed in utero to chemotherapeutic agents. *J Clin Oncol.* 5:1098-106.
- Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, Keppler D. 2006. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G640-9.
- Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. 2003. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 38: 374-84.
- Roberts, C.T., A. Sohlstrom, K.L. Kind, R.A. Earl, T.Y. Khong, J.S. Robinson, P.C. Owens, and J.A. Owens. 2001. Maternal food restriction reduces the exchange surface area and increases the barrier thickness of the placenta in the guinea-pig. *Placenta.* 22:177-85.
- Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. 2007. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26: 39-57.
- Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, Bates SE. 2009. ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 3-13.
- Roelofsen, H., M. Muller, and P.L. Jansen. 1997. Regulation of organic anion transport in the liver. *Yale J Biol Med.* 70:435-45.
- Rosso, P. 1980. Placental growth, development, and function in relation to maternal nutrition. *Fed Proc.* 39:250-4.
- Ruetz, S., and P. Gros. 1994. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell.* 77:1071-81.
- Ryter, S.W., and L.E. Otterbein. 2004. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays.* 26:270-80.
- Ryter, S.W., and R.M. Tyrrell. 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 28:289-309.
- Sata, R., H. Ohtani, M. Tsujimoto, H. Murakami, N. Koyabu, T. Nakamura, T. Uchiumi, M. Kuwano, H. Nagata, K. Tsukimori, H. Nakano, and Y. Sawada. 2005. Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther.* 315:888-95.
- Sati L, Seval Y, Yasemin Demir A, Kosanke G, Kohnen G, Demir R. 2007. Cellular diversity of human placental stem villi: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Acta Histochem* 109: 468-79.
- Satlin LM, Amin V, Wolkoff AW. 1997. Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange. *J Biol Chem* 272: 26340-5.
- Sato K, Sugawara J, Sato T, Mizutamari H, Suzuki T, Ito A, Mikkaichi T, Onogawa T, Tanemoto M, Unno M, Abe T, Okamura K. 2003. Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta* 24: 144-8.

Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. 2002. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99: 507-12.

Schinkel, A.H. 1998. Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 36:9-13.

Schmid R. 1976. The distinguished lecture: Pyrrolic victories. *Trans Assoc Am Physicians* 89: 64-76.

Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B. 1998. Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells. *Am J Physiol* 274: G370-5.

Schteingart CD, Eming SA, Ton-Nu HT, Crombie DL, Hofmann AF. 1992. Synthesis, structure and transport properties of fluorescent derivatives of conjugated bile acids. In *Bile Acids and Hepatobiliary System*. Paumgartner G, Gerok W, Stiel A, editors. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Germany. 177-183.

Schuetz, E.G., W.T. Beck, and J.D. Schuetz. 1996. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 49:311-8.

Sedlak, T.W., and S.H. Snyder. 2004. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics*. 113:1776-82.

Seeger, M.A., and H.W. van Veen. 2009. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta*. 1794:725-37.

Serini G, Gabbiani G. 1999. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 250: 273-83.

Serrano MA, Bayon JE, Pascolo L, Tiribelli C, Ostrow JD, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. 2002. Evidence for carrier-mediated transport of unconjugated bilirubin across plasma membrane vesicles from human placental trophoblast. *Placenta* 23: 527-35.

Serrano MA, Brites D, Larena MG, Monte MJ, Bravo MP, Oliveira N, Marin JJ. 1998. Beneficial effect of ursodeoxycholic acid on alterations induced by cholestasis of pregnancy in bile acid transport across the human placenta. *J Hepatol* 28: 829-39.

Serrano MA, Macias RI, Briz O, Monte MJ, Blazquez AG, Williamson C, Kubitz R, Marin JJ. 2007. Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta* 28: 107-17.

Serrano MA, Macias RI, Vallejo M, Briz O, Bravo A, Pascual MJ, St-Pierre MV, Stieger B, Meier PJ, Marin JJ. 2003. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta-maternal liver tandem excretory pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 515-24.

Serrano, M.A. 2008. Papel de la placenta en el desarrollo fetal y en la salud del adulto. In *Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas*. A.M. Pascual-Leone and J.M. Medina, editors. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid. 169-192.

Serrano, M.A., P. Bravo, M.Y. el-Mir, and J.J. Marin. 1993. Influence of hydroxylation and conjugation in cross-inhibition of bile acid transport across the human trophoblast basal membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1151:28-34.

Serrano, M.A., R.I. Macias, M. Vallejo, O. Briz, A. Bravo, M.J. Pascual, M.V. St-Pierre, B. Stieger, P.J. Meier, and J.J. Marin. 2003. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal

cholestasis in the rat placenta-maternal liver tandem excretory pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 305:515-24.

Setchell KD, Matsui A. 1983. Serum bile acid analysis. *Clin Chim Acta* 127: 1-17.

Setchell KD, Worthington J. 1982. A rapid method for the quantitative extraction of bile acids and their conjugates from serum using commercially available reverse-phase octadecylsilane bonded silica cartridges. *Clin Chim Acta* 125: 135-44.

Setchell, K.D., R. Dumaswala, C. Colombo, and M. Ronchi. 1988. Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile. *J Biol Chem.* 263:16637-44.

Shanks MR, Cassio D, Lecoq O, Hubbard AL. 1994. An improved polarized rat hepatoma hybrid cell line. Generation and comparison with its hepatoma relatives and hepatocytes in vivo. *J Cell Sci* 107 (Pt 4): 813-25.

Shapiro AB, Ling V. 1997. Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 250: 122-9.

Shayiq RM, Roberts DW, Rothstein K, Snawder JE, Benson W, Ma X, Black M. 1999. Repeat exposure to incremental doses of acetaminophen provides protection against acetaminophen-induced lethality in mice: an explanation for high acetaminophen dosage in humans without hepatic injury. *Hepatology* 29: 451-63.

Sherman IA, Fisher MM. 1986. Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy. *Hepatology* 6: 444-9.

Shi, X., S. Bai, A.C. Ford, R.D. Burk, E. Jacquemin, B. Hagenbuch, P.J. Meier, and A.W. Wolkoff. 1995. Stable inducible expression of a functional rat liver organic anion transport protein in HeLa cells. *J Biol Chem.* 270:25591-5.

Shneider BL, Moyer MS. 1993. Characterization of endogenous carrier-mediated taurocholate efflux from *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 268: 6985-8.

Shoda, J., R. Mahara, T. Osuga, M. Tohma, S. Ohnishi, H. Miyazaki, N. Tanaka, and Y. Matsuzaki. 1988. Similarity of unusual bile acids in human umbilical cord blood and amniotic fluid from newborns and in sera and urine from adult patients with cholestatic liver diseases. *J Lipid Res.* 29:847-58.

Smirlis, D., R. Muangmoonchai, M. Edwards, I.R. Phillips, and E.A. Shephard. 2001. Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics. *J Biol Chem.* 276:12822-6.

Smit JW, Huisman MT, van Tellingen O, Wiltshire HR, Schinkel AH. 1999. Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J Clin Invest* 104: 1441-7.

Smit, J.J., A.H. Schinkel, R.P. Oude Elferink, A.K. Groen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C.A. Mol, R. Ottenhoff, N.M. van der Lugt, M.A. van Roon, and et al. 1993. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell.* 75:451-62.

Smith, A.J., A. van Helvoort, G. van Meer, K. Szabo, E. Welker, G. Szakacs, A. Varadi, B. Sarkadi, and P. Borst. 2000. MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem.* 275:23530-9.

- Soroka, C.J., J.M. Lee, F. Azzaroli, and J.L. Boyer. 2001. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 33:783-91.
- Staud F, Vackova Z, Pospechova K, Pavek P, Ceckova M, Libra A, Cygalova L, Nachtigal P, Fendrich Z. 2006. Expression and transport activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in dually perfused rat placenta and HRP-1 cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 53-62.
- Staudinger J, Liu Y, Madan A, Habeebu S, Klaassen CD. 2001. Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 29: 1467-72.
- Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. 2000. Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118: 422-30.
- Stocker, R., Y. Yamamoto, A.F. McDonagh, A.N. Glazer, and B.N. Ames. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 235:1043-6.
- St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T. 2002. Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1856-63.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ. 2000. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1495-503.
- St-Pierre MV, Stallmach T, Freimoser Grundschober A, Dufour JF, Serrano MA, Marin JJ, Sugiyama Y, Meier PJ. 2004. Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1505-16.
- Stulc, J. 1997. Placental transfer of inorganic ions and water. *Physiol Rev*. 77:805-36.
- Sueyoshi, T., and M. Negishi. 2001. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41:123-43.
- Sun M, Kingdom J, Baczyk D, Lye SJ, Matthews SG, Gibb W. 2006. Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the human placenta decreases with advancing gestation. *Placenta* 27: 602-9.
- Sun, Y., and M.D. Maines. 1990. Heme oxygenase-2 mRNA: developmental expression in the rat liver and response to cobalt chloride. *Arch Biochem Biophys*. 282:340-5.
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. 2003. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* 278: 22644-9.
- Suzuki, H., and Y. Sugiyama. 2000. Transport of drugs across the hepatic sinusoidal membrane: sinusoidal drug influx and efflux in the liver. *Semin Liver Dis*. 20:251-63.
- Suzuki, M., H. Suzuki, Y. Sugimoto, and Y. Sugiyama. 2003. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem*. 278:22644-9.
- Synold, T.W., I. Dussault, and B.M. Forman. 2001. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med*. 7:584-90.
- Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. 2000. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 251-60.

- Tamura, A., K. Wakabayashi, Y. Onishi, M. Takeda, Y. Ikegami, S. Sawada, M. Tsuji, Y. Matsuda, and T. Ishikawa. 2007. Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Cancer Sci.* 98:231-9.
- Tanaka, Y., Y. Kobayashi, E.C. Gabazza, K. Higuchi, T. Kamisako, M. Kuroda, K. Takeuchi, M. Iwasa, M. Kaito, and Y. Adachi. 2002. Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282:G656-62.
- Tohma M, Takeshita H, Mahara R, Kurosawa T, Makino I. 1987. Determination of 3 beta,12 alpha-dihydroxy-5-cholesten-24-oic acid and related bile acids in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 421: 9-19.
- Tohma, M., R. Mahara, H. Takeshita, T. Kurosawa, S. Ikegawa, and H. Nittono. 1985. Synthesis of the 1 beta-hydroxylated bile acids and identification of 1 beta,3 alpha,7 alpha-trihydroxy- and 1 beta,3 alpha,7 alpha,12 alpha-tetrahydroxy-5 beta-cholestan-24-oic acids in human meconium. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 33:3071-3.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 349-63.
- Trauner, M., and J.L. Boyer. 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 83:633-71.
- Ugele B, Bahn A, Rex-Haffner M. 2008. Functional differences in steroid sulfate uptake of organic anion transporter 4 (OAT4) and organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) in human placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 111: 1-6.
- Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P. 2003. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E390-8.
- Ushigome, F., H. Takanaga, H. Matsuo, K. Tsukimori, H. Nakano, H. Ohtani, and Y. Sawada. 2001. Uptake mechanism of valproic acid in human placental choriocarcinoma cell line (BeWo). *Eur J Pharmacol.* 417:169-76.
- Utoguchi N, Chandorkar GA, Avery M, Audus KL. 2000. Functional expression of P-glycoprotein in primary cultures of human cytotrophoblasts and BeWo cells. *Reprod Toxicol* 14: 217-24.
- Vallejo M, Briz O, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ. 2006. Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol* 44: 1150-7.
- Van ISC, Van Der Wouden JM, Liebisch G, Schmitz G, Hoekstra D. 2004. Polarized membrane traffic and cell polarity development is dependent on dihydroceramide synthase-regulated sphinganine turnover. *Mol Biol Cell* 15: 4115-24.
- Vander Jagt, D.L., S.P. Wilson, and J.E. Heidrich. 1981. Purification and bilirubin binding properties of glutathione S-transferase from human placenta. *FEBS Lett.* 136:319-21.
- Vardhana PA, Illsley NP. 2002. Transepithelial glucose transport and metabolism in BeWo choriocarcinoma cells. *Placenta* 23: 653-60.
- Vavricka, S.R., J. Van Montfoort, H.R. Ha, P.J. Meier, and K. Fattinger. 2002. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology.* 36:164-72.
- Vlaming ML, Lagas JS, Schinkel AH. 2009. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 14-25.

- von Versen-Hoeynck, F.M., and R.W. Powers. 2007. Maternal-fetal metabolism in normal pregnancy and preeclampsia. *Front Biosci.* 12:2457-70.
- Vos, T.A., G.J. Hooiveld, H. Koning, S. Childs, D.K. Meijer, H. Moshage, P.L. Jansen, and M. Muller. 1998. Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology.* 28:1637-44.
- Wacher, V.J., J.A. Silverman, Y. Zhang, and L.Z. Benet. 1998. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci.* 87:1322-30.
- Wakabayashi Y, Lippincott-Schwartz J, Arias IM. 2004. Intracellular trafficking of bile salt export pump (ABCB11) in polarized hepatic cells: constitutive cycling between the canalicular membrane and rab11-positive endosomes. *Mol Biol Cell* 15: 3485-96.
- Wan, Y.J., D. An, Y. Cai, J.J. Repa, T. Hung-Po Chen, M. Flores, C. Postic, M.A. Magnuson, J. Chen, K.R. Chien, S. French, D.J. Mangelsdorf, and H.M. Sucov. 2000. Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol.* 20:4436-44.
- Wang H, Unadkat JD, Mao Q. 2008. Hormonal regulation of BCRP expression in human placental BeWo cells. *Pharm Res* 25: 444-52.
- Wang H, Zhou L, Gupta A, Vethanayagam RR, Zhang Y, Unadkat JD, Mao Q. 2006. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17beta-estradiol in human placental BeWo cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E798-807.
- Watanabe, N., N. Tsukada, C.R. Smith, and M.J. Phillips. 1991. Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol.* 113:1069-80.
- Watanabe, T., G. Hasegawa, T. Yamamoto, K. Hatakeyama, M. Suematsu, and M. Naito. 2003. Expression of heme oxygenase-1 in rat ontogeny. *Arch Histol Cytol.* 66:155-62.
- Weier, N., S.M. He, X.T. Li, L.L. Wang, and S.F. Zhou. 2008. Placental drug disposition and its clinical implications. *Curr Drug Metab.* 9:106-21.
- Wittenburg, H., and M.C. Carey. 2002. Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *J Clin Invest.* 110:605-9.
- Wolfe MW. 2006. Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. *Methods Mol Med* 121: 229-39.
- Xu, J., Y. Liu, Y. Yang, S. Bates, and J.T. Zhang. 2004. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem.* 279:19781-9.
- Yamaguchi, T., and H. Nakajima. 1995. Changes in the composition of bilirubin-IX isomers during human prenatal development. *Eur J Biochem.* 233:467-72.
- Yamaguchi, T., Y. Komoda, and H. Nakajima. 1994. Biliverdin-IX alpha reductase and biliverdin-IX beta reductase from human liver. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 269:24343-8.
- Yanase, K., S. Tsukahara, J. Mitsuhashi, and Y. Sugimoto. 2006. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein-therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Lett.* 234:73-80.
- Ye S, Yao Z, Na G, Wang J, Ma D. 2007. Rapid simultaneous determination of 14 sulfonamides in wastewater by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 30: 2360-9.

- Yeboah D, Sun M, Kingdom J, Baczyk D, Lye SJ, Matthews SG, Gibb W. 2006. Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 1251-8.
- Yoshiki, N., T. Kubota, and T. Aso. 2000. Expression and localization of heme oxygenase in human placental villi. *Biochem Biophys Res Commun*. 276:1136-42.
- Young, A.M., C.E. Allen, and K.L. Audus. 2003. Efflux transporters of the human placenta. *Adv Drug Deliv Rev*. 55:125-32.
- Zelcer N, Reid G, Wielinga P, Kuil A, van der Heijden I, Schuetz JD, Borst P. 2003. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J* 371: 361-7.
- Zelcer, N., K. van de Wetering, R. de Waart, G.L. Scheffer, H.U. Marschall, P.R. Wielinga, A. Kuil, C. Kunne, A. Smith, M. van der Valk, J. Wijnholds, R.O. Elferink, and P. Borst. 2006. Mice lacking Mrp3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides. *J Hepatol*. 44:768-75.
- Zeng, H., G. Liu, P.A. Rea, and G.D. Kruh. 2000. Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res*. 60:4779-84.
- Zinchuk, V.S., T. Okada, K. Akimaru, and H. Seguchi. 2002. Asynchronous expression and colocalization of Bsep and Mrp2 during development of rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 282:G540-8.
- Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M. 2006. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* 3: 231-51.
- Zucker, S.D., and W. Goessling. 2000. Mechanism of hepatocellular uptake of albumin-bound bilirubin. *Biochim Biophys Acta*. 1463:197-208.

AIMS

Potentially toxic endogenous compounds, such as bile acids and biliary pigments, as well as many xenobiotics, such as drugs and food components are biotransformed and eliminated by the hepatobiliary system with the collaboration of the kidney. However, the situation is very different during pregnancy because the fetal liver produces biliary compounds in spite of the fact that this organ, owing to its immaturity, is not able to eliminate them into bile. Moreover, the excretory ability of the fetal kidneys is also very limited. Thus, during the intrauterine life the major route to eliminate fetal bile acids and biliary pigments is their transfer to the mother across the placenta. The maternal liver and, to a lesser extent, the maternal kidney, are then in charge of their biotransformation and elimination into feces and urine, respectively.

For many years, our group has been studying the mechanisms involved in placental transfer of bile acids and bilirubin. Functional experiments using plasma membrane preparations obtained from the basal or apical poles of human trophoblast indicated that the uptake of these compounds was carried out by a sodium-independent anion exchanger, which permitted to suggest that members of the OATP family could be involved in the uptake of organic anions by the placenta. However, the efflux across the apical pole of the trophoblast toward the maternal blood was found to be an ATP-dependent mechanism, which suggests that this process could be carried out by ABC proteins. Indeed, during the last years, several OATP and ABC isoforms have been found to be expressed in human placenta.

The aim of the present work was to further identify and characterize the transport systems involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta.

To achieve this general goal we established the following partial objectives:

- Identification and localization in human healthy placenta of OATP and ABC transporters that may be involved in the fetal-maternal transfer of cholephilic organic anions.
- To characterize “in vitro” models to be used in further studies addressing the regulation of the expression and function of the plasma membrane transporters involved in this aspect of the physiology and pharmacology of the placenta.
- To investigate the mechanisms accounting for the handling of fetal biliverdin, and more precisely to elucidate whether several OATP isoforms involved in the liver uptake of organic anions may play a role in the carrier-mediated uptake of fetal biliverdin by the placenta.
- To investigate whether ABC proteins expressed in human placenta may play a role in bile acid transfer across this organ.

1. LOCALIZATION OF TRANSPORTER PROTEINS IN HUMAN TERM PLACENTA

Prior to investigate the localization of transport proteins in human placenta at term, the different cell types present in this tissue were identified using several cell-specific antibodies. Human placenta sections were stained with anti-CK-7 antibody to detect trophoblast cells (figure 1A), anti-VeCad antibody to identify endothelial cells (figure 1B), anti-CD163 antibody as a marker for fetal macrophages, i.e., Hofbauer cells (figure 1C), and anti- α SMA antibody to detect smooth muscle cells and myofibroblasts (figure 1D). The localization of these markers in the chorionic villus was that expected from the cellular organization of this tissue.

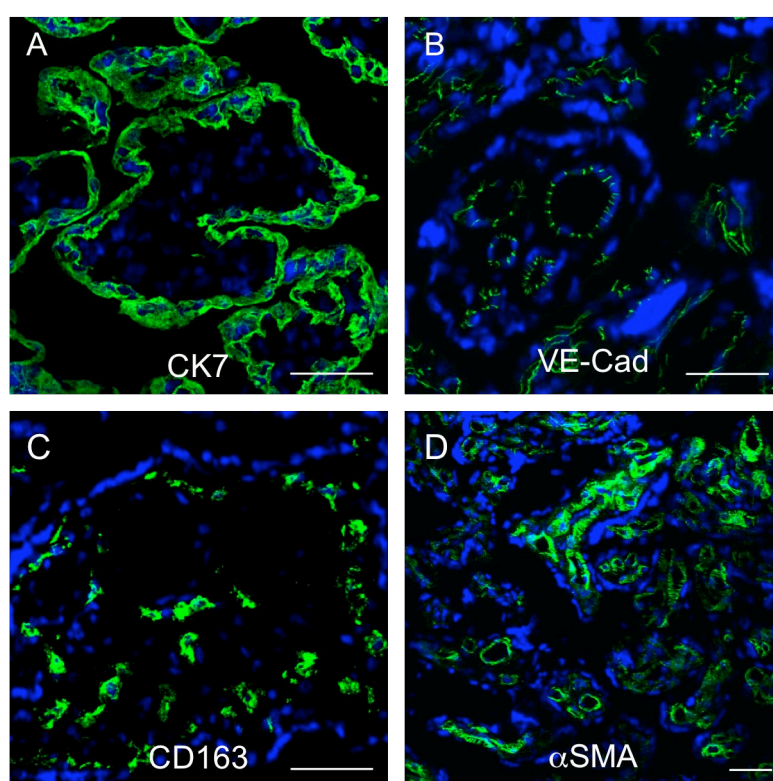


Figure 1. Representative images of human term placenta sections obtained with antibodies against CK-7 (A), Ve-Cad (B), CD163 (C), and α -SMA (D) used to identify trophoblast cells, endothelial cells, fetal macrophages or Hofbauer cells and smooth muscle cells, respectively. Nuclei were stained with Dapi. Bars: 50 μ m.

Figure 2 shows immunofluorescence of OATP1B1 in the placental corionic villi (red). The double-labelled images demonstrated no co-localization of this transporter protein in trophoblast cells, but, mainly in fetal capillary, and to a lesser extent in Hofbauer cells, as demonstrated by co-localization with VE-Cad and CD163 antibodies (data not shown).

These results explain why OATP1B1 mRNA was not detected in isolated trophoblast cells while we found low levels in whole placenta. In a study carried out by Patel *et al.* (Patel *et al.*, 2003), OATP1B1 mRNA was found at very low levels in first trimester

placentas, but not in third trimester tissue, which suggests a minor role of this transporter, at least under physiological circumstances.

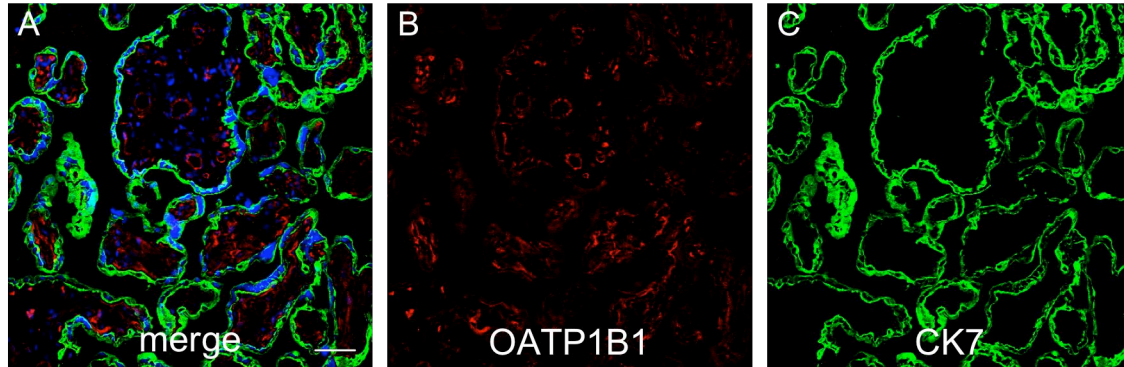


Figure 2. Localization of OATP1B1 in human control placenta at term. Five- μ m cryosections were fixed and processed for double-label immunofluorescence using anti-OATP1B1 (red) and anti-CK-7 (green) antibodies. The merged image shows nuclei stained with Dapi. Bar: 50 μ m.

Cell-specific distribution of OATP1B3 (figure 3) in human control placentas was similar to that observed for OATP1B1. A weak immunoreactivity was detected in CK-7-positive trophoblast cells (arrow heads in figure 3) and fetal macrophages and the signal was stronger in fetal capillaries (data not shown).

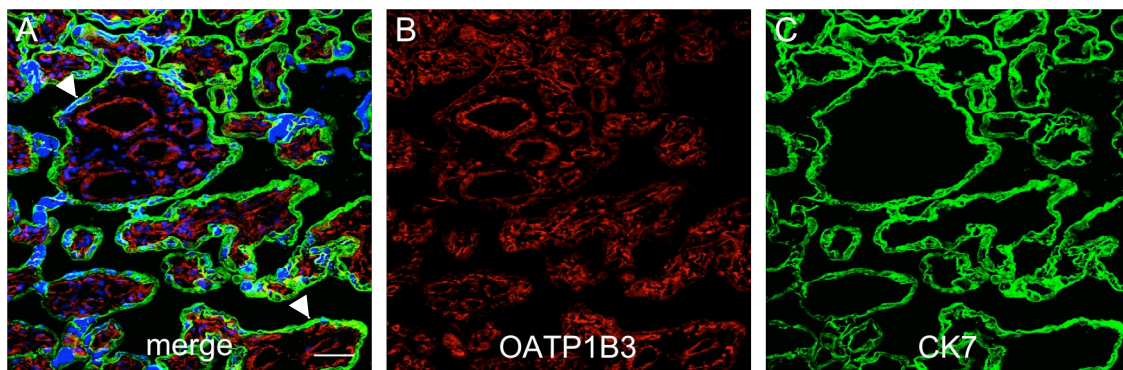


Figure 3. Localization of OATP1B3 in human control placenta at term. Five- μ m cryosections were fixed and processed for double-label immunofluorescence using anti-OATP1B3 (red) and anti-CK-7 (green) antibodies. The merged image shows nuclei stained with Dapi. Bar: 50 μ m.

As commented above, OATP1B3 is able to transport bile acids, and conjugated and unconjugated bilirubin. Therefore, although its expression in the placenta is lower than

in the liver, OATP1B3 can be considered a probable candidate, among OATP isoforms, to participate in the uptake of organic anions by the trophoblast.

Regarding ABC proteins, some years ago, the presence of MRP1, MRP2 and MRP3 in human placenta was demonstrated by western blot and immunofluorescence (St-Pierre et al., 2000).

To confirm the results of MRP4 mRNA expression obtained in isolated trophoblast, the localization of MRP4 was investigated by immunofluorescence. Our results showed that this export pump is localized in the apical side of the trophoblast (arrow heads in figure 4).

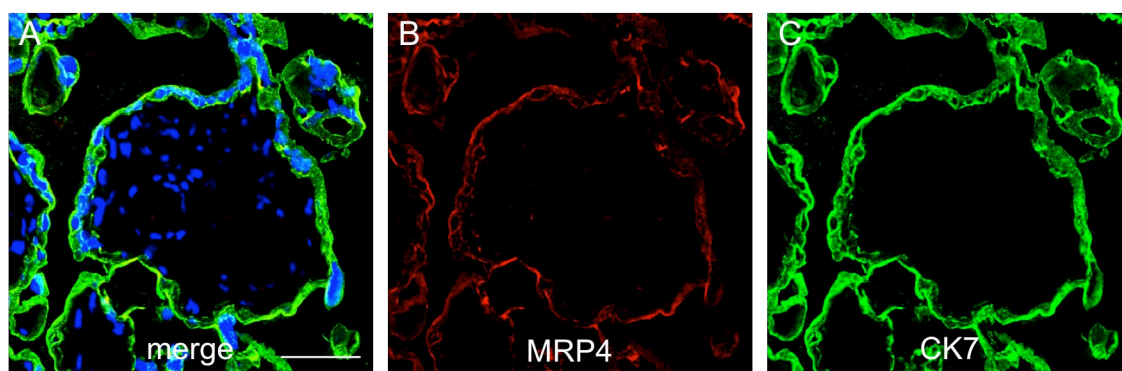


Figure 4. Localization of MRP4 in human control placenta at term. Five- μ m cryosections were fixed and processed for double-label immunofluorescence using anti-MRP4 (red) and anti-CK-7 (green) antibodies. The merged image shows nuclei stained with Dapi. Bar: 50 μ m.

The presence of MRP4 in the maternal facing apical brush-border membrane of the trophoblast suggests that this export pump may play an important role in facilitating the transfer of organic anions to the mother or decreasing fetal exposure to potentially toxic compounds present in the maternal circulation.

References

- Patel P, Weerasekera N, Hitchins M, Boyd CA, Johnston DG, Williamson C. 2003. Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta* 24: 39-44.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ. 2000. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1495-503.

2. EXCRETION OF FETAL BILIVERDIN BY THE RAT PLACENTA-MATERNAL LIVER TANDEM

The first products of heme catabolism are Fe, CO and the blue-green pigment biliverdin (BV) (Ryter y Tyrrell, 2000). BV is further biotransformed into bilirubin (BR) by BV-IX α reductase (BVR α), which is expressed in many tissues (McCoubrey et al., 1995), including the placenta (McDonagh et al., 1981). BR is conjugated in the liver with glucuronic acid by BR uridine diphosphate-glucuronosyl transferase-1A1 (Bosma et al., 1994) prior secretion into bile.

Owing to the immaturity of the fetal liver, physiologically relevant hepatobiliary elimination of BR does not occur. The concentrations of unconjugated BR are higher in fetal than in maternal serum (Knudsen y Lebech, 1989; Monte et al., 1995). Two facts contribute to this difference: a very active heme catabolism, and hence BR production in the fetus, together with very low BR uridine diphosphate-glucuronosyl transferase activity in the fetal liver (Kawade y Onishi, 1981). Thus, during intrauterine life, the placenta is the major route for the excretion of fetal biliary pigments (Marin et al., 2003).

The physiological advantages of the transformation of BV into BR have only recently been understood. Thus generation of endogenous CO, a potent vasodilator, may play a role in the control of local fetal-placental vasculature tone (McLean et al., 2000). Moreover, in the presence of reactive oxygen species, BR can be oxidized to BV and then recycled by BVR α back to BR (Baranano et al., 2002). However, beneficial antioxidant properties are limited to low concentrations because BR can also cause irreversible damage or even death when it becomes accumulated and reaches the brain at high levels (Gourley, 1997). It has also been suggested that the reduction of BV to BR could have the evolutionary advantage of facilitating the placental excretion of bile pigments by simple diffusion (Schmid, 1976). However, results from *in vitro* (Serrano et al., 2002) and *in vivo* (Briz et al., 2003a) studies have suggested that under physiological circumstances the major pathway for BR transfer across the placenta involves carrier-mediated transport across both poles of the plasma membrane of the human trophoblast (Serrano et al., 2002). Moreover, BR does not undergo any major biotransformation during its residence in the rat placenta (Briz et al., 2003a).

Vectorial properties for transplacental BR transfer are consistent with the moderate increase in serum BR concentrations observed in the fetuses of pregnant rats with hyperbilirubinemia due to common bile duct ligation (Macias et al., 2000). How fetal biliary pigments are taken up by the placenta is not well understood.

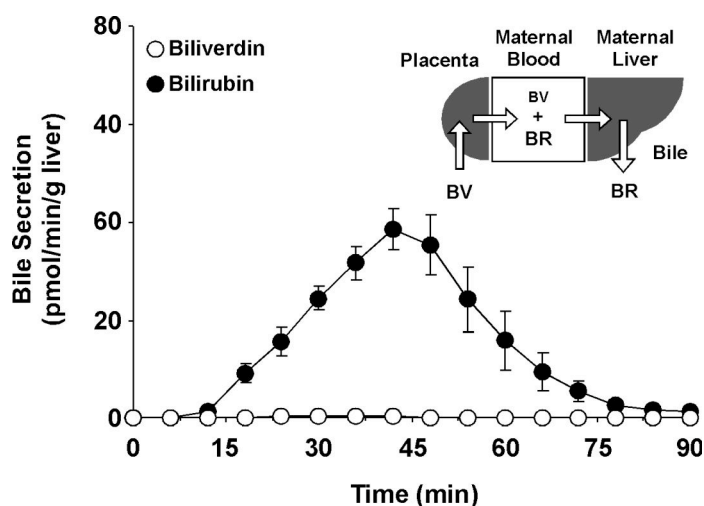
Proteins of the OATP family (Hagenbuch y Meier, 2004), in particular human OATP1B1 and OATP1B3, have been reported to confer the ability to take up unconjugated BR when expressed in *Xenopus laevis* oocytes (Briz et al., 2003b). Regarding BV, although this biliary pigment is able to inhibit BR transfer in rat placenta when co-administered through the umbilical artery of "in situ" perfused rat placentas (Briz et al.,

2003a), it has been shown that BV itself is poorly transferred, without prior reduction to BR, across the guinea pig placenta (McDonagh et al., 1981).

The aim of this study was to gain information on the handling of fetal BV by elucidating whether several Oatp isoforms involved in the liver uptake of organic anions may play a role in the carrier-mediated uptake of fetal BV by the rat placenta and liver, and by measuring the levels of expression of BVR α in the three elements of the fetal-liver-placenta-maternal liver trio involved in the handling of fetal BV in native form or biotransformed into BR.

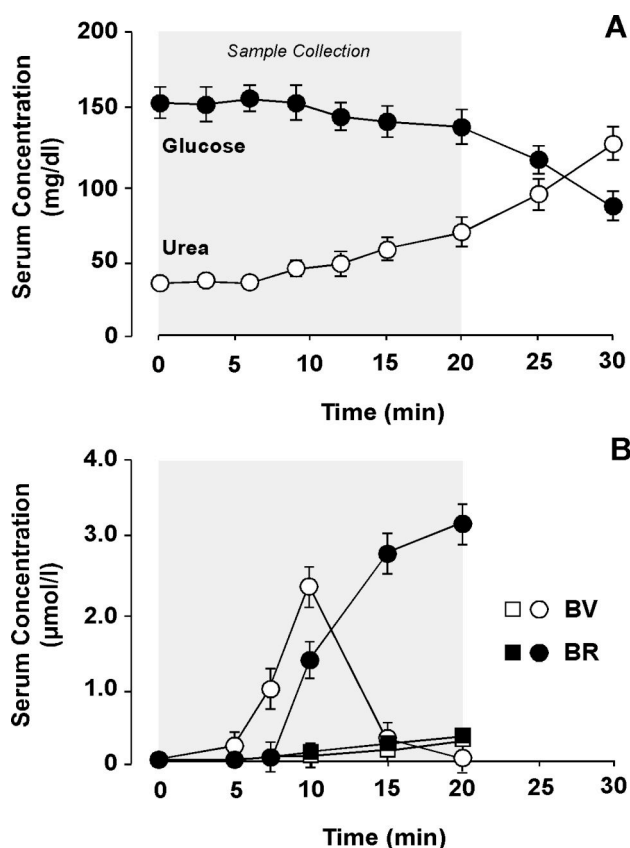
To evaluate the overall handling of BV by the placenta-maternal liver tandem 1.0 μ mol BV was administered through the umbilical artery of “in situ” perfused rat placentas in a single-pass perfusion system (Figure 1). Only 1.6% of the pigment, almost all of it (99%) biotransformed into BR, was recovered in maternal bile over the following 90 min (15.5 ± 3.2 nmol BR plus 0.13 ± 0.05 nmol BV).

Figure 1. Time course of biliverdin (BV) and bilirubin (BR) bile secretion after the administration of 1 μ mol BV over 5 min through the umbilical artery of the in situ perfused rat placenta. Values are expressed as means \pm SD from 5 experiments. The inset depicts the schematic representation of the experimental model.



Moreover, in a different set of experiments, 1.0 μ mol BV was administered through the umbilical artery of “in situ” perfused rat placentas just after vascular isolation of the maternal liver and kidneys (Figure 2). The result was that a peak in serum BV concentrations appeared before the general deterioration, which occurred after 20 min, as monitored by increasing levels of urea and decreasing glucose concentrations in maternal serum. A transient peak in BV concentration was followed by a delayed (5-10 min), and progressive, increase in unconjugated BR, but not in conjugated BR (data not shown), concentrations in maternal serum (Figure 2). The magnitude of the increase in serum concentrations for BV and BR are consistent with the amount of BR secreted into bile when BV was administered to animals with intact liver and kidney circulation. No detectable spontaneous accumulation of any of these pigments was observed in animals up to 20 min after vascular isolation of the liver and kidneys when

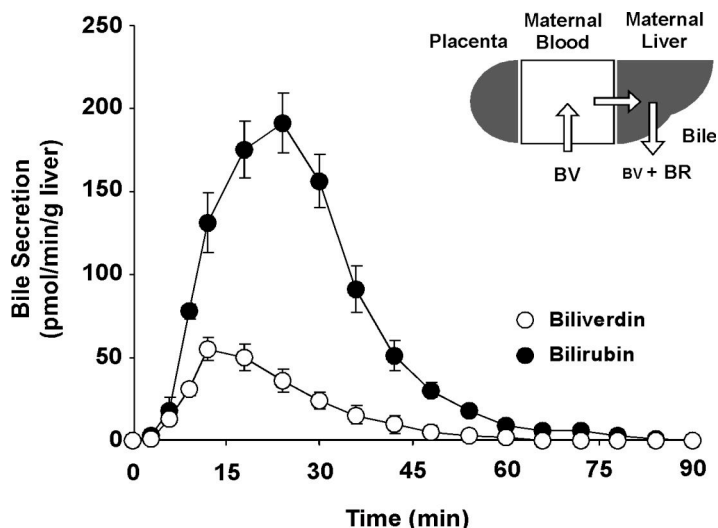
BV was not administered through the umbilical artery (BV was not detected and BR concentrations remained below 0.3 μM) (Figure 2).



A **Figure 2.** (A) Changes in serum glucosa and urea concentrations following rapid isolation from the circulation of the liver and kidneys of pregnant rats at minute 0 using ligatures previously emplace around the portal vein, the hepatic artery and the renal arteries and veins. (B) time course of biliverdin (BV) and bilirubin (BR) concentrations in maternal serum samples collected for 0 to 20 minutes. Immediately after vascular isolation of maternal liver and kidneys, 1 μmol BV was (circles, $n=5$) or was not (squares, $n=4$) administered over 5 minutes through the umbilical artery of the in situ perfused rat placenta on day 21 of pregnancy. Values are expressed as means \pm SD.

To measure the proportion of BV converted into BR by the maternal liver after crossing the placenta, a dose of 10% of that administered through the umbilical artery, i.e., 0.1 μmol , was administered directly into the maternal circulation by injection through the jugular vein (Figure 3). Approximately 80% of this amount was eliminated in bile over the following 90 min as a mixture of BR and BV. Most of the secreted pigments (80%, 61.7 ± 3.6 nmol) were found to be BV biotransformed into BR, but a smaller although considerable amount (20%, 15.7 ± 4.0 nmol) was secreted in bile as BV.

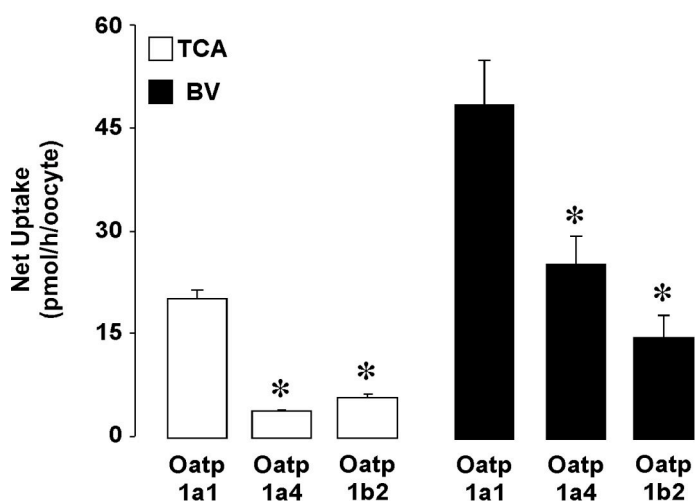
Figure 3. Time course of biliverdin (BV) and bilirubin (BR) bile secretion after the administration of 0,1 μ mol BV as a 5-min bolus through the jugular vein of 21 day pregnant rats. Values means \pm SD from 5 experiments. The inset depicts the schematic representation of the experimental model.



To study the ability of several Oatp isoforms to transport BV, these transporters were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and BV uptake was measured in a HPLC system.

When carrier-mediated uptake (uptake in injected oocytes minus that in non-injected oocytes) was calculated, the ability of three members of the OATP family, involved in the uptake of organic anions by the rat liver to induce sodium-independent uptake of taurocholic acid (TCA) (Oatp1b2 > Oatp1a1 > Oatp1a4) was observed (Figure 4). This was more marked for BV (Oatp1a1 > Oatp1a4 > Oatp1b2) (Figure 4).

Figure 4. Sodium-independent uptake of [³H]-taurocholic acid ([³H]-TCA) and biliverdin (BV) by *Xenopus laevis* oocytes injected with 7 ng cRNA of Oatp1a1, Oatp1a4 or Oatp1b2. Oocytes were incubated in uptake medium (100 mM choline chloride, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ and 10 mM HEPES/Tris, pH 7.0) containing 50 μ M [³H]-TC or 100 μ M BV at 25°C for 60 min. BV uptake was measured by HPLC, following an incubation-lysis-extraction protocol carried out with two oocytes in each measurement. Values are expressed as means \pm SD from at least 15 determinations and represent net uptake, calculated by subtracting the uptake by oocytes injected with TE buffer without cRNA. *, $p < 0.05$, on comparison using the Bonferroni method for multiple-range testing with the uptake of the same substrate by oocytes injected with Oatp1a1 cRNA.



To investigate the relevance of Oatps as transporters responsible for BV uptake by the rat placenta their expression levels in this organ were determined by measurement of their absolute abundance of mRNA (Figure 5A). In all cases, the expression levels were markedly lower in placenta than in maternal liver. Moreover, the most abundant isoform in the placenta was Oatp1a1. When these values were corrected by the amount of trophoblast, using the rat placental lactogen type II mRNA as a marker, the abundance of mRNA for Oatp1a1 was 7-to 8-fold higher than that for Oatp1a4 and Oatp1b2 (Figure 5B).

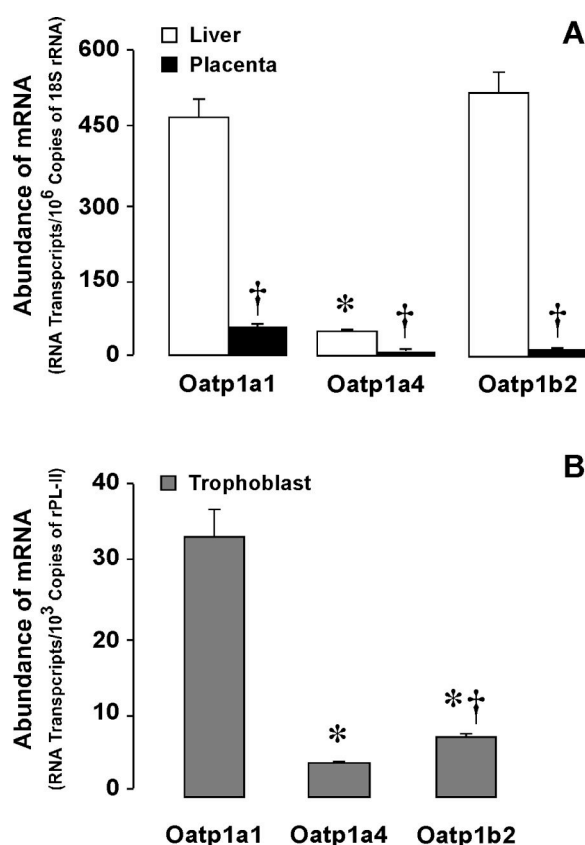


Figure 5. Absolute abundance of mRNA for Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2 in liver, placenta (A) and trophoblast (B) in 21 day pregnant rats. Values are expressed as means \pm SD from determinations carried out by real-time quantitative RT-PCR using total RNA obtained from these organs. At least 10 different preparations for each tissue were obtained, and RT-PCR was performed in triplicate for each sample. Levels of mRNA in each sample were normalized on the basis of the content in 18S rRNA. Values for trophoblast tissue were calculated by correcting the abundance of mRNA for each carrier by that for rat placental lactogen type II (rLP-II), used as a specific trophoblast marker. *, $p < 0.05$, on comparison of different carriers in the same tissue by the Bonferroni method for multiple-range testing. †, $p < 0.05$, on comparison of liver and placenta by the paired t-test.

To study the potential contribution of fetal and maternal livers and the placenta to the biotransformation of fetal BV into BR, the relative abundance of BVR α in these organs was determined by real time quantitative RT-PCR.

In figure 6 the relative abundance of ARNm of Bvr α enzyme is shown in fetal liver, placenta and maternal liver in rats on day 21 of pregnancy. As observed, the highest abundance of its ARNm was found in fetal liver (271%), followed by maternal liver (114%) and the placenta (102%).

Cholestasis imposed in pregnant rats during the last week of pregnancy induced a marked increase in BVR α mRNA and the protein levels in placenta and in the maternal and fetal liver.

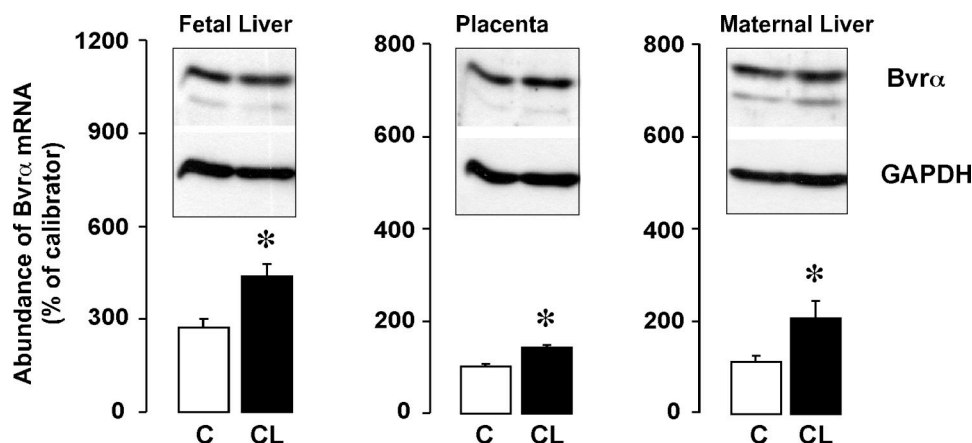


Figure 6. Relative abundance of mRNA for BVR α in fetal liver, placenta and maternal liver on day 21 of pregnancy. On day 14, pregnant rats underwent a sham operation (control) or obstructive cholestasis (CL). Values are expressed as percentages of the external calibrator. In all groups $n=6$ mothers and ≥ 12 fetuses. *, $p < 0.05$, on comparing with control group in each organ by t-test. The inset show representative Western blot analyses of BVR α in liver and placenta homogenates from the same experimental groups. GAPDH was used to confirm equal protein loading.

The present study provides direct evidence that several of the Oatps expressed in rat placenta and maternal liver are able to take up BV from the fetal and maternal circulations. Among them, Oatp1a1 and Oatp1b2 are abundantly expressed in the maternal liver, and together with the contribution to a lesser extent of Oatp1a4 may play an important role in BV uptake from the maternal blood. As regards the placenta, Oatp1a1, owing to its ability to transport BV and its high expression as compared to that of Oatp1a4 and Oatp1b2, is probably the most important of these three transporters contributing to BV uptake by this organ from fetal blood. Nevertheless, other transporters may also participate in this function.

In *in vivo* experiments, only a minor part of the amount of BV that was taken up by the rat placenta was rapidly released toward the mother, followed by a delayed release of BR. This suggests that the transport of BV from the trophoblast toward the mother is very poor and/or that placental biotransformation of BV into BR is very efficient. Indeed, our results confirm the expression in rat placenta of BVR α , whose enzymatic activity has previously been reported (McDonagh et al., 1981). Moreover, expression levels of this enzyme in the placenta are consistent with the observed extensive

biotransformation of BV into BR during placental transit. The fact that the expression of BVR α in fetal liver was even higher than in placenta, suggests that an important part of endogenous BV produced by the fetus could be transformed into BR by the fetal liver prior to being taken up by the placenta.

An interesting observation of the present study was that the impairment in maternal bile secretion induced an up-regulation of BVR α in fetal and maternal liver and also in placenta. This probably enhances the ability of these organs to regenerate BR from BV as part of the redox cycle, BR being an important defense mechanism against oxidative stress (Baranano et al., 2002), such as that caused by maternal cholestasis (Perez et al., 2005).

In conclusion, our results suggest that among transporters involved in fetal BV uptake by the rat placenta, several Oatps, in particular Oatp1a1, may be involved. Once in the placenta, and prior to transfer to the mother, BV is extensively converted into BR by BVR α . The small amount of BV that reaches the maternal blood is efficiently taken up, probably in part by Oatp1a1, Oatp1a4 and Oatp1b2, and biotransformed into BR, which joins fetal BR transferred as such by the placenta, to be eliminated mainly through secretion into bile by the maternal liver.

References

- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16093-8.
- Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL. 1994. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 269: 17960-4.
- Briz O, Macias RI, Serrano MA, Gonzalez-Gallego J, Bayon JE, Marin JJ. 2003a. Excretion of foetal bilirubin by the rat placenta-maternal liver tandem. *Placenta* 24: 462-72.
- Briz O, Serrano MA, Macias RI, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. 2003b. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J* 371: 897-905.
- Gourley GR. 1997. Bilirubin metabolism and kernicterus. *Adv Pediatr* 44: 173-229.
- Hagenbuch B, Meier PJ. 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447: 653-65.
- Kawade N, Onishi S. 1981. The prenatal and postnatal development of UDP-glucuronyltransferase activity towards bilirubin and the effect of premature birth on this activity in the human liver. *Biochem J* 196: 257-60.
- Knudsen A, Lebech M. 1989. Maternal bilirubin, cord bilirubin, and placenta function at delivery and the development of jaundice in mature newborns. *Acta Obstet Gynecol Scand* 68: 719-24.
- Macias RI, Pascual MJ, Bravo A, Alcalde MP, Larena MG, St-Pierre MV, Serrano MA, Marin JJ. 2000. Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology* 31: 975-83.
- Marin JJ, Macias RI, Serrano MA. 2003. The hepatobiliary-like excretory function of the placenta. A review. *Placenta* 24: 431-8.
- McCoubrey WK, Jr., Cooklis MA, Maines MD. 1995. The structure, organization and differential expression of the rat gene encoding biliverdin reductase. *Gene* 160: 235-40.

- McDonagh AF, Palma LA, Schmid R. 1981. Reduction of biliverdin and placental transfer of bilirubin and biliverdin in the pregnant guinea pig. *Biochem J* 194: 273-82.
- McLean M, Bowman M, Clifton V, Smith R, Grossman AB. 2000. Expression of the heme oxygenase-carbon monoxide signalling system in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2345-9.
- Monte MJ, Rodriguez-Bravo T, Macias RI, Bravo P, el-Mir MY, Serrano MA, Lopez-Salva A, Marin JJ. 1995. Relationship between bile acid transplacental gradients and transport across the fetal-facing plasma membrane of the human trophoblast. *Pediatr Res* 38: 156-63.
- Perez MJ, Macias RI, Duran C, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. 2005. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 43: 324-32.
- Ryter SW, Tyrrell RM. 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28: 289-309.
- Schmid R. 1976. The distinguished lecture: Pyrrolic victories. *Trans Assoc Am Physicians* 89: 64-76.
- Serrano MA, Bayon JE, Pascolo L, Tiribelli C, Ostrow JD, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. 2002. Evidence for carrier-mediated transport of unconjugated bilirubin across plasma membrane vesicles from human placental trophoblast. *Placenta* 23: 527-35.

3. ADAPTATIVE RESPONSE OF ABC PROTEINS IN HUMAN CHORIOCARCINOMA CELL LINES TO GENE EXPRESSION MODULATORS

Several ABC proteins are involved in the function of the placenta as a barrier to protect the fetus. These include MRP1, MRP4 and ABCG2, whose expression levels are higher than in the liver.

We used human choriocarcinoma cell lines, BeWo, JAr and Jeg-3, as an *in vitro* model to study the effect of different modulators of gene expression on the mRNA levels of MRP1, MRP4 and ABCG2 determined by real time RT-PCR.

The following gene expression modulators were chosen:

- Sodium butyrate, a classic inducer of gene expression, commonly used on cultured mammalian cells.
- Chenodeoxycholic acid (CDCA), a natural ligand of FXR nuclear receptor (Zollner et al., 2006), and one of the bile acids whose serum concentrations are increased in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy (Pascual et al., 2002; Serrano et al., 1998).
- Acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol, APAP), a commonly used analgesic and antipyretic agent with known ability to affect the expression of genes involved in hepatic detoxification.

Determination of MRP1, MRP4 and ABCG2 mRNA levels in control and butyrate-treated cells is shown in figure 1. MRP4 levels were enhanced by sodium butyrate. The increase was 4-fold higher in treated BeWo cells than in control cells. Moreover, ABCG2 expression was down-regulated by this fatty acid. In fact, a 50% reduction in BeWo and Jeg-3 cells and 80% in JAr cells was found compared to non-treated cells. Butyrate exposure also induced down-regulation of MRP1 in JAr and Jeg-3 cells.

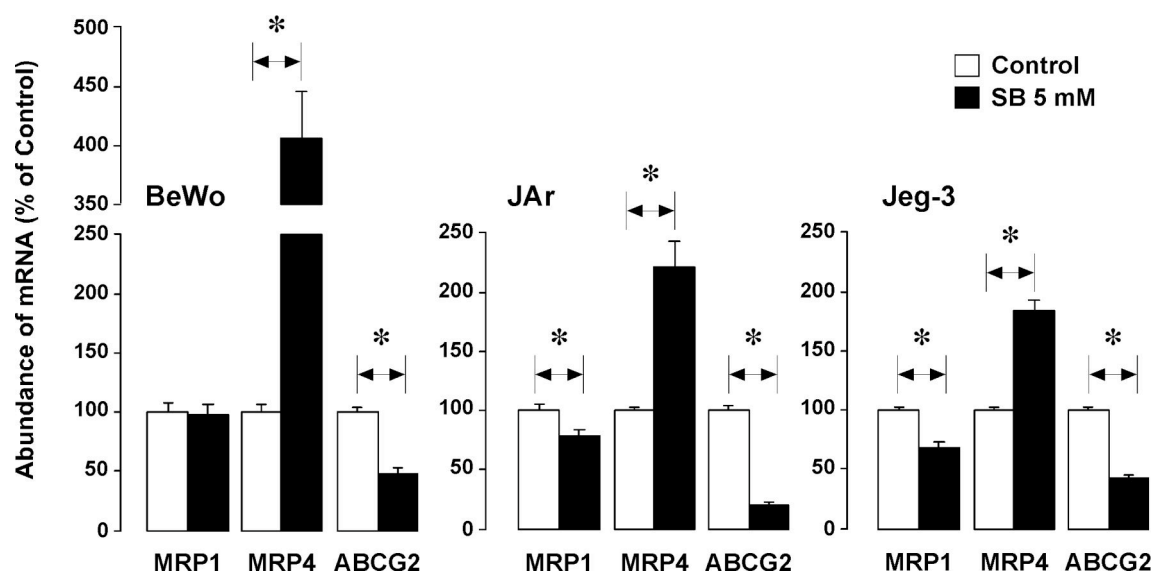


Figure 1. Effect of sodium butyrate (SB) on mRNA expression levels of MRP1, MRP4, and ABCG2 in choriocarcinoma cell lines. Cells were cultured in the presence of 5 mM of SB for 24 h. The results are expressed as percentage of levels found in untreated cells (control) and were corrected by the amount of 18S rRNA determined in each sample. Values are means \pm SEM from measurements carried out in triplicate from three different cultures. *, $p < 0.05$ as compared with control by the Students' t-test.

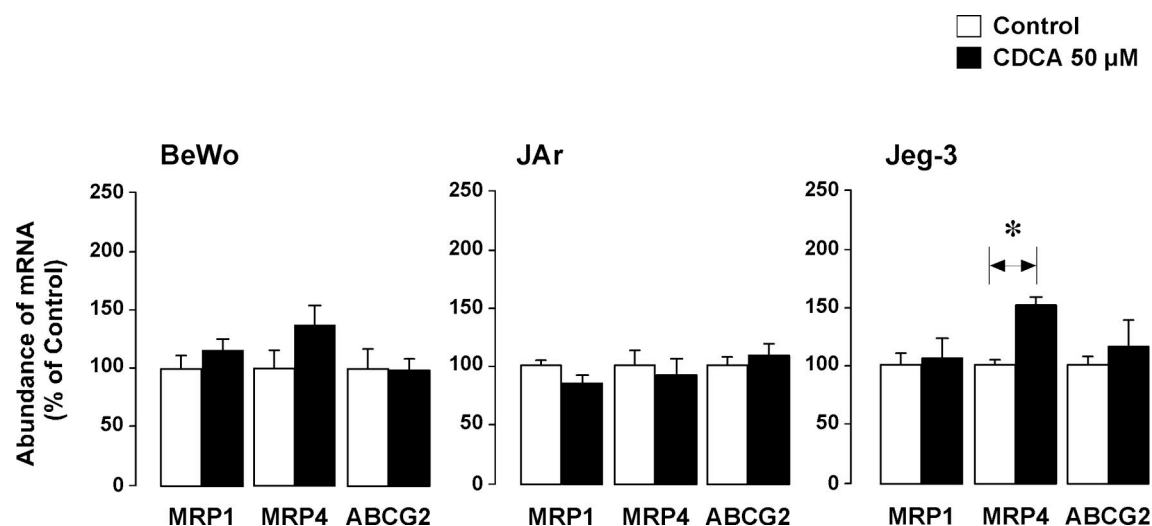


Figure 2. Effect of chenodeoxycholic acid (CDCA) on expression levels of mRNA of MRP1, MRP4 and ABCG2 choriocarcinoma cell lines. Cells were cultured in the presence of 50 μ M of CDCA for 72 h. The results are expressed as percentage of levels found in untreated cells (control) and were corrected by the amount of 18S rRNA determined in each sample. Values are means \pm SEM from measurements carried out in triplicate from three different cultures. *, $p < 0.05$ as compared with control by the Students' t-test.

When cells were treated with 50 μ M of CDCA, only MRP4 expression levels were modified (figure 2). A moderate increase was observed in treated BeWo cells, while the amount of transcripts in treated Jeg-3 cells was 50% higher than controls.

Several studies suggest that the resistance to toxic effects of APAP that has been described in response to the administration of subtoxic doses of this drug is probably related to the induction of ABC proteins (Aleksunes et al., 2008a; Dalhoff et al., 2001; Shayiq et al., 1999). To test this hypothesis, the effect of subtoxic doses of APAP on MRP1, MRP4 and ABCG2 expression levels was determined in BeWo, JAr and Jeg-3 cells.

The subtoxic concentration of APAP in each cell line was determined in a preliminary screening in which cell viability was measured after exposure of cells to a broad range of concentrations (from 20 μ M to 40 mM) (data not shown).

The subtoxic concentration was defined as the concentration just before the one producing a reduction on cell viability. This concentration was 1 mM for BeWo and JAr cells and 5 mM for Jeg-3 cells.

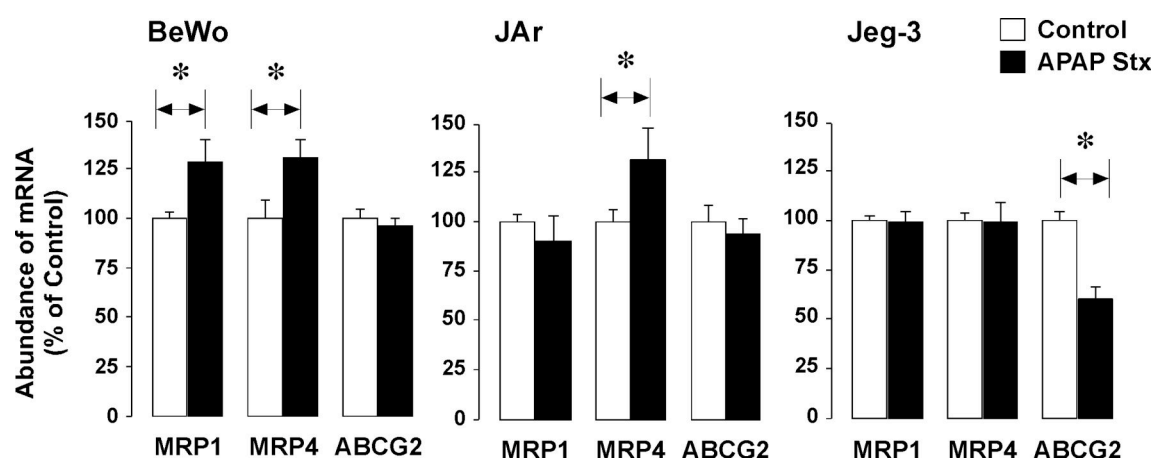


Figure 3. Effect of subtoxic concentration of acetaminophen (APAP Stx) on MRP1, MRP4 and ABCG2 mRNA expression levels in choriocarcinoma cell lines, determined by real time RT-PCR. Cells were cultured in the absence or presence of 1 mM (BeWo and JAr) or 5 mM (Jeg-3) of APAP for 48 h. The results are expressed as percentage of levels found in untreated cells (control) and were corrected by the amount of 18S rRNA determined in each sample. Values are means \pm SEM from measurements carried out in triplicate from three different cultures. *, $p < 0.05$ as compared with control by the Students' t-test.

The incubation of cells in the presence of the appropriate subtoxic concentration of APAP for 48 h, induced a significant increase of MRP4 mRNA in BeWo and JAr treated

cells (figure 3). A significant induction of MRP1 was also found in treated BeWo cells. However, MRP1 and MRP4 levels did not change in treated Jeg-3 cells but ABCG2 was down-regulated.

The induction of MRPs, but not ABCG2, observed under our experimental conditions in BeWo and JAr treated cells correlates with recently studies carried out using mice in which hepatic damage was elicited by APAP (Aleksunes et al., 2006; Aleksunes et al., 2008b), and others in which repeated administration of subtoxic doses of APAP produced a marked induction of Mrps, specially Mrp3 and Mrp4, and as a consequence, the animals developed resistance to APAP hepato-toxicity (Aleksunes et al., 2008a; Ghanem et al., 2009). Our study suggested that MRP1 may be involved in the chemoresistance to APAP.

Taking together, these results suggest that MRP4 could play a role in the function of the placenta as a barrier to protect the fetus. In the presence of potentially toxic compounds these cells over-express MRP4 as a defense mechanism.

References

- Aleksunes LM, Campion SN, Goedken MJ, Manautou JE. 2008a. Acquired resistance to acetaminophen hepatotoxicity is associated with induction of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4) in proliferating hepatocytes. *Toxicol Sci* 104: 261-73.
- Aleksunes LM, Scheffer GL, Jakowski AB, Pruijboom-Brees IM, Manautou JE. 2006. Coordinated expression of multidrug resistance-associated proteins (Mrps) in mouse liver during toxicant-induced injury. *Toxicol Sci* 89: 370-9.
- Aleksunes LM, Slitt AL, Maher JM, Augustine LM, Goedken MJ, Chan JY, Cherrington NJ, Klaassen CD, Manautou JE. 2008b. Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 226: 74-83.
- Dalhoff K, Laursen H, Bangert K, Poulsen HE, Anderson ME, Grunnet N, Tygstrup N. 2001. Autoprotection in acetaminophen intoxication in rats: the role of liver regeneration. *Pharmacol Toxicol* 88: 135-41.
- Ghanem CI, Ruiz ML, Villanueva SS, Luquita M, Llesuy S, Catania VA, Bengochea LA, Mottino AD. 2009. Effect of repeated administration with subtoxic doses of acetaminophen to rats on enterohepatic recirculation of a subsequent toxic dose. *Biochem Pharmacol* 77: 1621-8.
- Pascual MJ, Serrano MA, El-Mir MY, Macias RI, Jimenez F, Marin JJ. 2002. Relationship between asymptomatic hypercholanemia of pregnancy and progesterone metabolism. *Clin Sci (Lond)* 102: 587-93.
- Serrano MA, Brites D, Larena MG, Monte MJ, Bravo MP, Oliveira N, Marin JJ. 1998. Beneficial effect of ursodeoxycholic acid on alterations induced by cholestasis of pregnancy in bile acid transport across the human placenta. *J Hepatol* 28: 829-39.
- Shayiq RM, Roberts DW, Rothstein K, Snawder JE, Benson W, Ma X, Black M. 1999. Repeat exposure to incremental doses of acetaminophen provides protection against acetaminophen-induced lethality in mice: an explanation for high acetaminophen dosage in humans without hepatic injury. *Hepatology* 29: 451-63.
- Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M. 2006. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* 3: 231-51.

4. ROLE OF ABCG2 IN THE TRANSPORT OF BILE ACIDS

Potentially toxic endogenous compounds, such as bile acids and biliary pigments, as well as many xenobiotics, such as drugs and food components are biotransformed and eliminated by the hepatobiliary system with the collaboration of the kidney. However, the situation is very different during pregnancy because the fetal liver produces biliary compounds in spite of this organ, owing to its immaturity, is not able to eliminate them into bile. Moreover, the excretory ability of the fetal kidneys is also very limited. Thus during the intrauterine life the major route to eliminate fetal bile acids and biliary pigments is their transfer to the mother across the placenta. The maternal liver and, in a lesser extent, the maternal kidney, are then in charge of their biotransformation and elimination into feces and urine, respectively.

Biliary excretion of bile acids or their conjugates with glucuronate or sulphate is performed by efflux pumps belonging to the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) proteins. Among these, is BSEP, which is the major mechanism for bile acid pumping into bile by the liver (Byrne et al., 2002; Gerloff et al., 1998). However, BSEP does not seem to play a major role in the placental transfer of these compounds.

MRP2 plays an important role in detoxification and chemoprotection by transporting a wide range of compounds, especially conjugates of lipophilic substances with glutathione, sulphate and glucuronate, such as bilirubin or bile acids (Akita et al., 2001; Jedlitschky et al., 1997; Keppler et al., 1997). This isoform is specifically expressed in the apical membrane domain of polarised cells, including hepatocytes and placental syncytiotrophoblasts (Jedlitschky et al., 2006).

MDR1, also named P-glycoprotein, which is also located in the canalicular plasma membrane of hepatocytes, mediates biliary secretion of hydrophobic cationic and amphipatic compounds, is believed to do not be involved in the transport of bile acids (Muller et al., 1994).

ABCG2 is localized in the canalicular plasma membrane of hepatocytes and the apical membrane of syncytiotrophoblast (Maliepaard et al., 2001). There are some evidences suggesting that this export pump can extrude from cells several steroids, including sulphated bile acids derivatives (Janvilisri et al., 2005; Suzuki et al., 2003). However, its physiological role in these tissues remains to be fully elucidated.

The aim of the present study was to investigate whether ABCG2 might play a role in the transport of bile acids. The study was carried out using two experimental models: polarized cisplatin-resistant subline, WIF-B9/R, which over-expresses ABCG2, but does not express BSEP, to investigate the vectorial traffic of bile acids in intact cells (Briz et al., 2007) and heterologous expression of transport proteins in *Xenopus laevis* oocytes.

4.1. Transport of bile acids by ABCG2 in WIF-B9/R cells

To demonstrate the ability of WIF-B9/R to transport bile acids we used a fluorescent bile acid derivative, cholyglycylamide fluorescein (CGamF), which has been previously used to characterize the mechanisms of bile acid secretion (Kitamura et al., 1990; Sherman y Fisher, 1986).

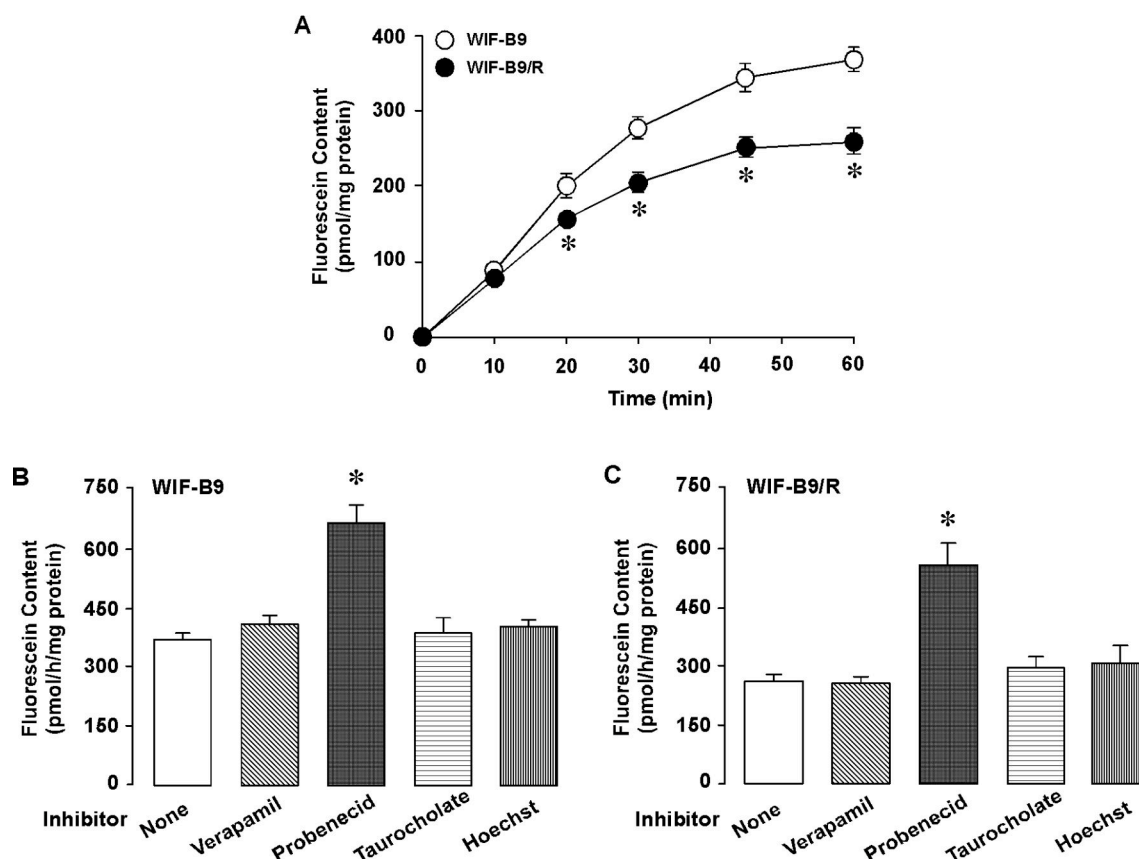


Figure 1. Time-course of fluorescein uptake by wild-type (WIF-B9) and cisplatin-resistant (WIF-B9/R) cells (A), and effect of different compounds on fluorescein content in WIF-B9 (B) and WIF-B9/R cells (C). Cells were incubated with 10 μ M fluorescein diacetate in the absence (None) or presence of the following inhibitors: 10 μ M verapamil, 500 μ M probenecid, 50 μ M taurocholate or 50 μ M Hoechst 33342 at 37°C for 1 h. Values are means \pm SD from three different cultures carried out in triplicate. * p < 0.05 compared with wild-type cells (A) or in the absence of inhibitors (B, C).

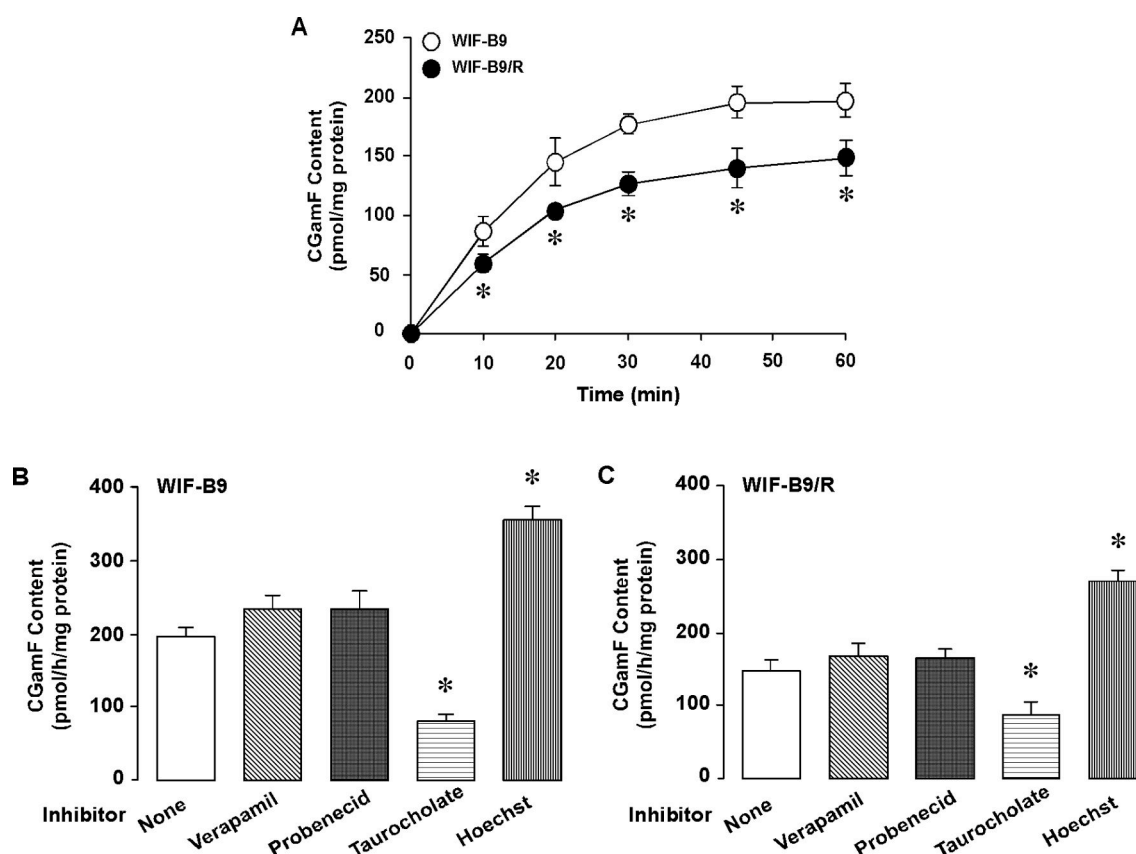


Figure 2. Time-course of cholyglycylamido fluorescein (CGamF) uptake by wild-type (WIF-B9) and cisplatin-resistant (WIF-B9/R) cells (A) and effect of different compounds on CGamF content (B, C). Cells were incubated with 5 μ M CGamF in the absence (None) or presence of the following inhibitors: 10 μ M verapamil, 500 μ M probenecid, 50 μ M taurocholate or 50 μ M Hoechst 33342 at 37°C for 1 h. Values are means \pm SD from three different cultures carried out in triplicate. * p < 0.05 compared with wild-type cells (A) or in the absence of inhibitors (B, C).

The intracellular accumulation of fluorescein (Figure 1A) and CGamF (Figure 2A) in WIF-B9/R cells was lower than in WIF-B9 cells.

When cells were incubated with fluorescein in the presence of well-known inhibitors of MDR1 (verapamil), MRPs (probenecid), a substrate of MDR1 and ABCG2 (Hoechst 33342) or a substrate of several isoforms of MRPs (taurocholate) we found that only probenecid markedly enhanced cellular load of fluorescein (Figures 1B-1C), which was interpreted as the result of inhibiting fluorescein efflux.

However, CGamF cell accumulation was markedly increased in the presence of Hoechst 33342 and decreased by co-incubation with taurocholate (Figures 2B-2C).

To determine whether differences in efflux process could be involved in changes in overall cell load, we studied the efflux of CGamF from cells previously loaded with this bile acid derivative. The highest ability to export this compound was found in WIF-B9/R. Only the substrate of ABCG2, Hoechst 33342, but not inhibitors of MDR1 or MRPs, reduced CGamF efflux (Figure 3).

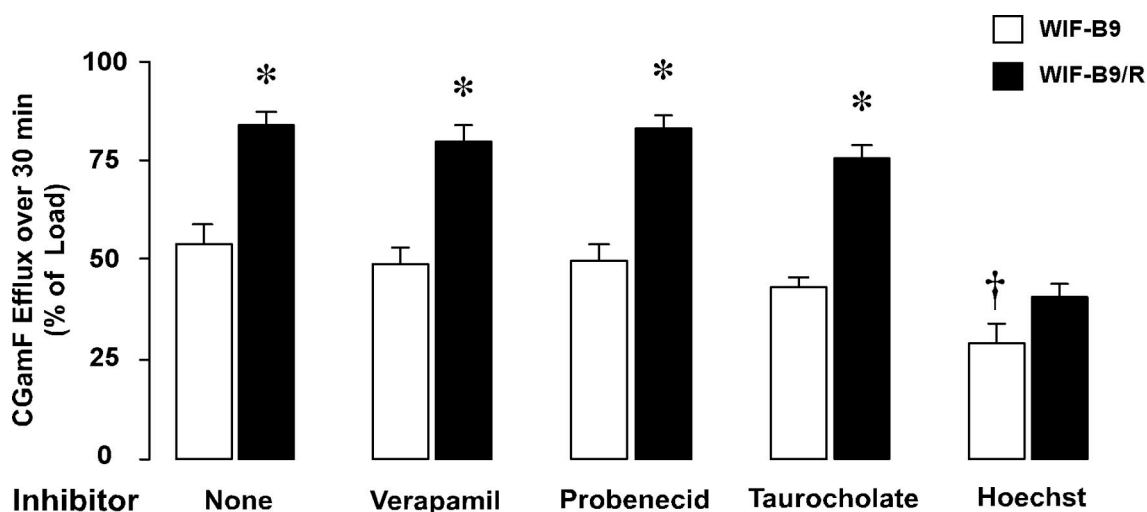


Figure 3. Effect of different compounds on CGamF efflux over 30 min in WIF-B9 and WIF-B9/R cells. Experiments were carried out by loading the cells with 5 μ M CGamF contained in Tyrode-Hepes (144 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM NaH₂PO₄, 1.25 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, Hepes 10 mM, pH 7.4) by incubation at 37°C for 1 h in the absence (None) or in the presence of the following inhibitors: 10 μ M verapamil, 500 μ M probenecid, 50 μ M taurocholate or 50 μ M Hoechst 33342. Then, cells were put into a thermostatically controlled holder on the stage of an inverted microscope and perfused with Tyrode-Hepes medium at 37°C containing or not the inhibitors to be tested. Values are means \pm SD from at least 15 different cells from two cultures. *, $p < 0.05$ as compared with WIF-B9 cells. †, $p < 0.05$ as compared with None by the Bonferroni method for multiple-range testing.

Although CGamF could reach bile canaliculi (BC) structures formed by these cells through the paracellular route, previous studies (Bravo et al., 1998) and our efflux experiments indicate that CGamF is mainly transported transcellularly from the medium to the BC. Inhibitors of MDR1 and MRP2, verapamil and probenecid, respectively, were not able to inhibit CGamF efflux from previously loaded WIF-B9/R cells, which suggests that these export pumps do not transport CGamF.

However, Hoechst 33342, inhibited CGamF efflux from WIF-B9/R cells, which suggests that this bile acid derivative may be transported by ABCG2.

4.2. Transport of bile acids by ABCG2 in *Xenopus laevis* oocytes

To further elucidate the ability of ABCG2 to transport bile acids the human ortholog of this carrier was cloned from human choriocarcinoma cells JAr. The integrity of the nucleotide sequence was confirmed to be 100%, prior to synthesize the corresponding mRNA and express the transporter in *Xenopus laevis* oocytes.

ABCG2 was detected in the plasma membrane of ABCG2-expressing oocytes (Figure 4B) but not in wild-type oocytes (Figure 4A) as demonstrated by immunofluorescence using a specific antibody against ABCG2.

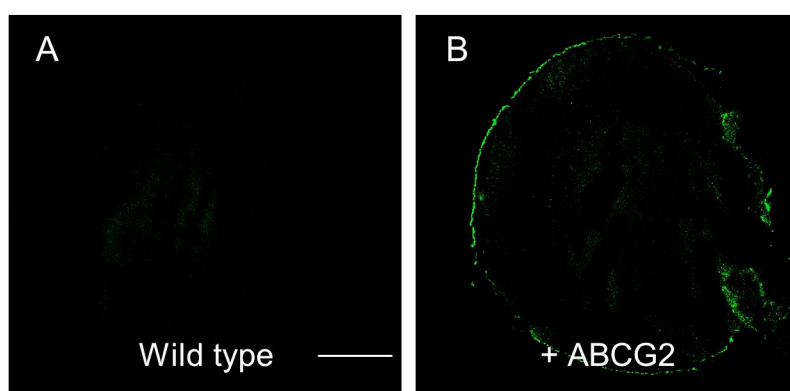


Figure 4. Immunolocalization of ABCG2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Immunofluorescence analysis was performed in wild-type oocytes (A) and in oocytes microinjected 48 h before with the cRNA of ABCG2 (B). Bar: 250 μ m.

Transport activity of the ABCG2 expressed in oocytes was confirmed by using two substrates of this protein: Hoechst 33342, and [3 H]-MX, (Doyle et al., 1998; Scharenberg et al., 2002). Oocytes expressing ABCG2 presented lower cell load of both substrates than wild-type cells (Figures 5A-5B), 20% less of Hoechst 33342 and 50% less of MX. In the presence of 5 μ M of fumitremorgine C (FTC), a specific inhibitor of ABCG2 (Rabindran et al., 2000), a significant increase of Hoechst 33342 and MX content was observed in oocytes expressing ABCG2 (Figures 5A-5B).

Because bile acids cannot cross the plasma membrane by simple diffusion it was necessary to co-express ABCG2 with a transport protein able to take up organic anions; we selected rat Oatp1a1. The functionality of this model was confirmed by expressing Oatp1a1 together with Bsep or Mrp2 in oocytes (Figure 5C-5D). Oatp1a1-expressing oocytes presented a higher cell load of taurocholate (Figure 5C) and

E₂17 β G (Figure 5D) used as typical substrates of rat Bsep and rat Mrp2, respectively. The co-expression of Oatp1a1 and Bsep or Mrp2 produced a significant reduction of net uptake of both compounds mediated by Oatp1a1.

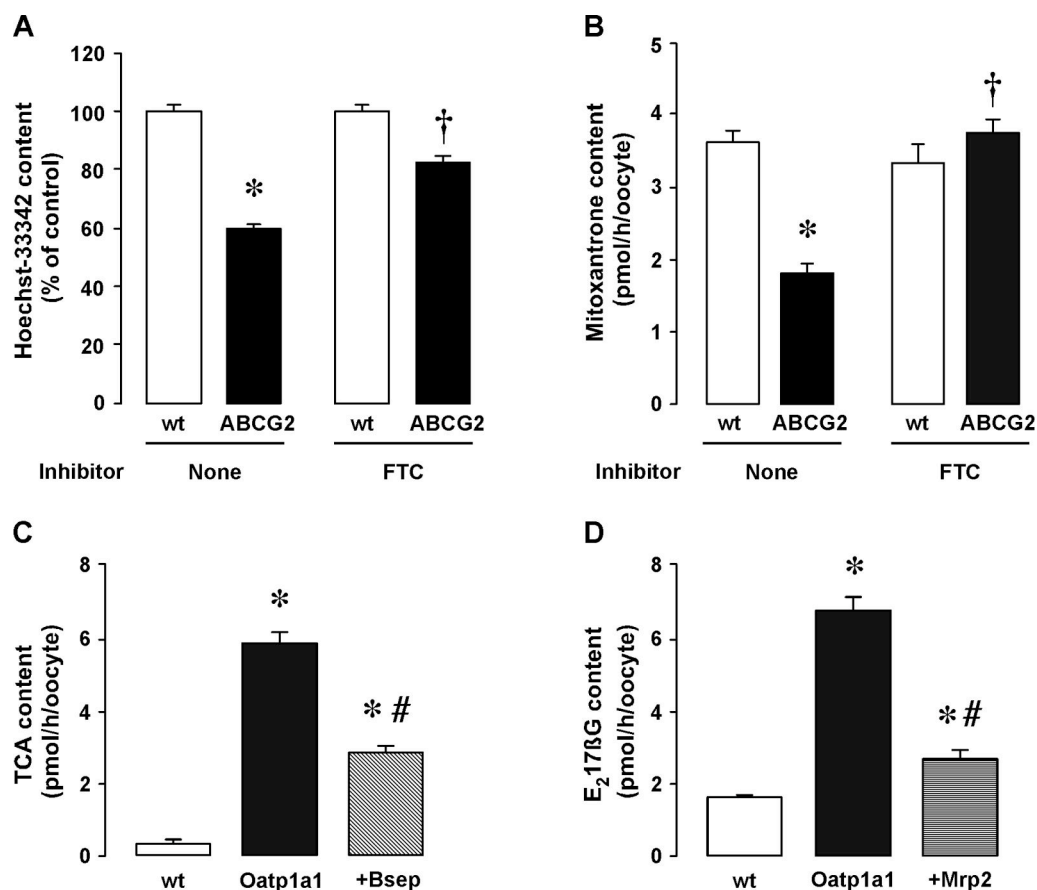


Figure 5. Functional expression of ABCG2 (A-B) and Oatp1a1 alone or co-expressed with Bsep (C) or Mrp2 (D) in *Xenopus laevis* oocytes. Oocytes were incubated in uptake medium containing 200 μ M Hoechst-3342 (A) or 10 μ M [³H]Mitoxantrone (B) in the presence or absence of 5 μ M FTC, or 20 μ M [¹⁴C]taurocholic acid (TCA) (C) or 10 μ M [³H]Estradiol 17 β -D-glucuronide (E₂17 β G) (D), at 25°C for 1 h. Results are means \pm SD from at least 30 determinations per data point using oocytes from three different frogs. *, $p < 0.05$ as compared with wild-type cells (wt) by the paired t-test (A and B) or by the Bonferroni method for multiple-range testing (C and D); †, $p < 0.05$ comparing ABCG2-expressing oocytes incubated with or without FTC by the paired t-test. #, $p < 0.05$ compared with oocytes expressing Oatp1a1 alone by the paired t-test.

This strategy is a suitable method to load bile acid in the oocytes and to determine the efflux activity of ABC pumps. The co-expression of Oatp1a1 and BCRP in these cells did not change the subcellular localization (Figure 6) and the functional activity of ABCG2 (data not shown).

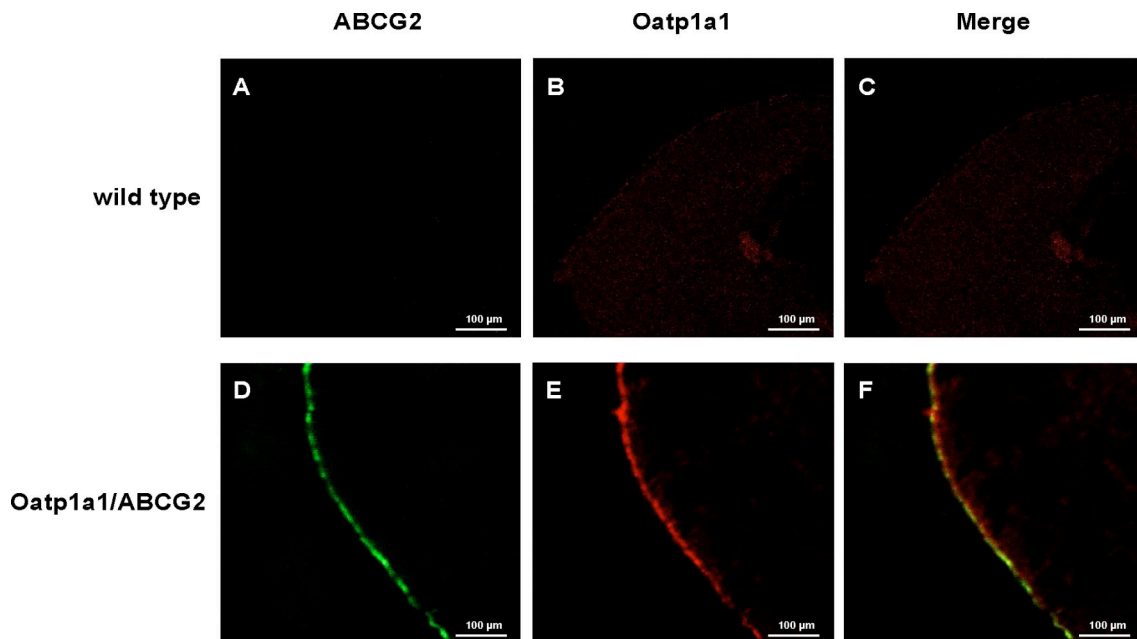


Figure 6. Immunolocalization of ABCG2 and Oatp1a1 in Oatp1a1/ABCG2 co-expressing oocytes (D-F), 48 h after the microinjection of cRNA of both transporters, and in wild-type cells (A-C) by confocal immunofluorescence microscopy. 5 µm-slices were incubated with specific antibodies against ABCG2 (green) and Oatp1a1 (red). Pictures C and F show the overlay of panels A and B, or D and E, respectively. Bars, 100 µm.

To choose the best conditions to investigate the ability of ABCG2 to export primary bile acids, oocytes were injected with 7 ng of Oatp1a1 mRNA and 7 ng of ABCG2 (1:1) or with 4 ng of Oatp1a1 and 12 ng of ABCG2 (1:3).

Figure 7 shows the efflux of primary bile acids mediated by ABCG2 or Bsep (determined by subtraction of the cell load of oocytes expressing Oatp1a1 minus the cell load of oocytes co-expressing Oatp1a1 and ABC pumps) after 1 h at 25°C in the presence of 50 µM different bile acids. Bsep was used as a positive control of the experiment.

All primary bile acids tested were efficiently exported by ABCG2. The relationship 1:3 produced a significant increase in the efflux of bile acids mediated by these pumps compared to the 1:1 mRNA ratio. So, in the experiments we used a relationship Oatp1a1: ABC pump (1:3).

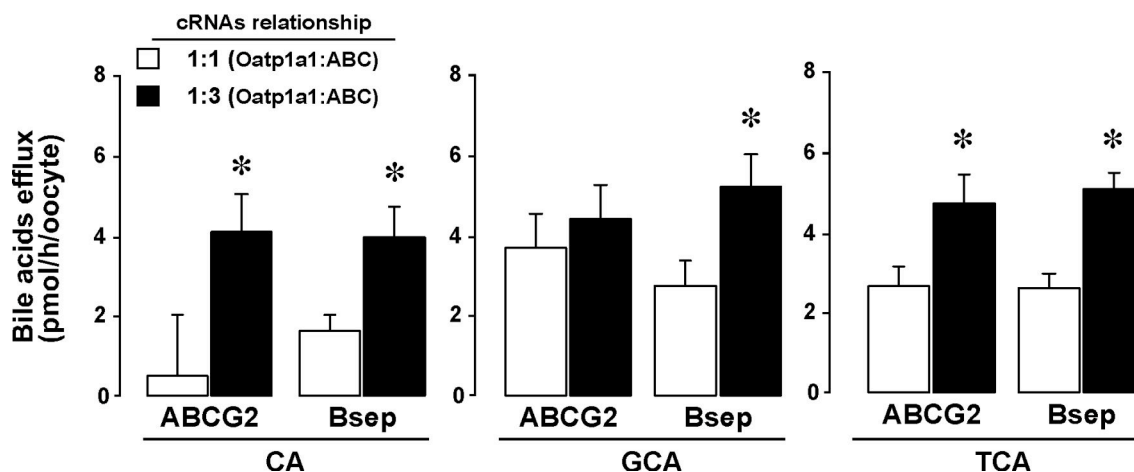


Figure 7. ABCG2- and Bsep-mediated efflux of bile acids in *Xenopus laevis* oocytes. Oocytes co-expressing Oatp1a1 and ABCG2 or Bsep were incubated in uptake medium containing 50 μ M of [3 H]cholic acid (CA), [14 C]glycocholic acid (GCA) and [3 H]taurocholic acid (TCA) at 25°C for 1 h. Efflux was determined by subtraction cell load of oocytes expressing Oatp1a1 minus cell load of oocytes coexpressing ABC pumps. Values are means \pm SD from at least 20 determinations per data point using oocytes from three different frogs. *, $p < 0.05$ as compared with oocytes injected with 1:1 relationship of mRNA by the paired t-test.

Our results suggested that ABCG2 had the ability to transport primary bile acids. Since previous studies suggested that ABCG2 transports sulphated compounds (Imai et al., 2003; Suzuki et al., 2003), our next step was to analyze the ability of ABCG2 to transport taurolithocholic-3-sulfate acid (TLCSA). Figure 8 shows the TLCSA content in oocytes measured by LC-MS-MS.

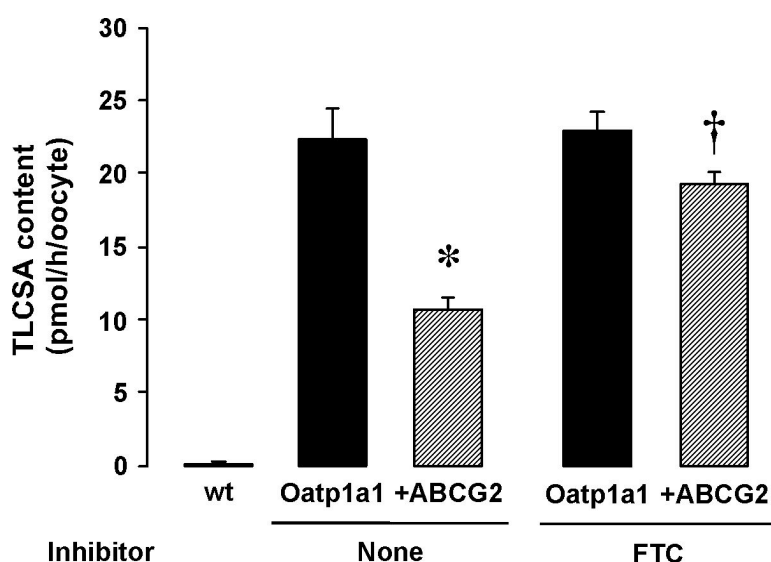


Figure 8. ABCG2-mediated transport of taurolithocholic-3-sulfate acid (TLCSA) in the presence or absence of the ABCG2 inhibitor FTC. Wild-type (wt) oocytes and cells expressing Oatp1a1 alone or with ABCG2 were incubating in uptake medium containing 50 μ M TLCSA in the presence or absence of 5 μ M FTC at 25°C for 1 h. Values are means \pm SD from at least 20 determinations per data point using oocytes from three different frogs. *, $p < 0.05$ as compared with Oatp1a1 + ABCG2 (None) by the paired t-test.

0.05 compared with Oatp1a1-expressing oocytes by the paired t-test. †, $p < 0.05$ comparing ABCG2-expressing oocytes incubated with or without FTC by the paired t-test.

The uptake of TSLCA mediated by Oatp1a1 was significantly reduced in ABCG2-co-expressing oocytes. In the presence of 5 μM of FTC a significant increase of TSLCA content in ABCG2 expressing oocytes was observed.

The next step to confirm the transport of TSLCA by ABCG2 expressed in oocytes required the synthesis of radiolabeled TSLCA (data not shown), which was loaded in oocytes by microinjection.

The time course of TSLCA content confirmed that ABCG2 was able to export this compound from the cell (Figure 9). The TSLCA content was reduced (~20%) in oocytes expressing ABCG2 or rat Bsep.

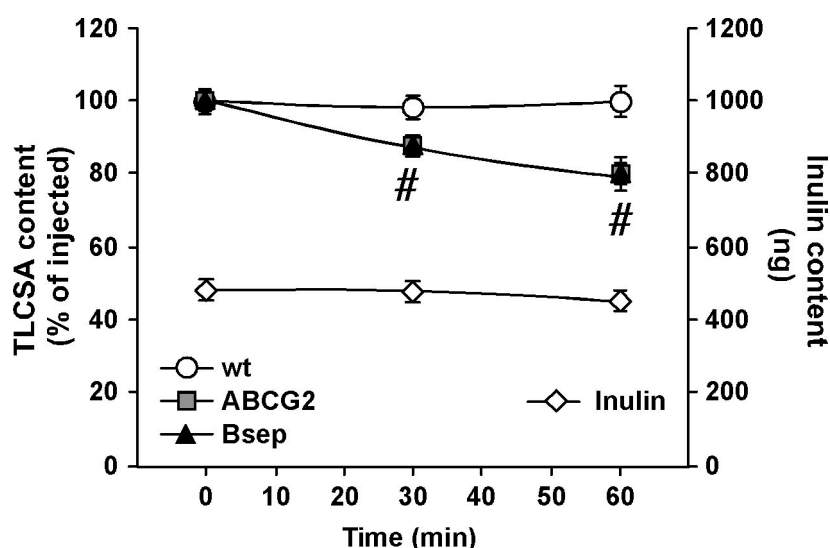


Figure 9. Time course of [^{14}C]-TSLCA efflux from oocytes previously loaded by microinjection. Oocytes expressing ABCG2, Bsep or wild-type (wt) cells were microinjected with 50 nl solution containing 100 μM [^3H]-inulin and 300 μM [^{14}C]-TSLCA before being incubated in a substrate free uptake medium at 25°C for 1 h. The inulin content was constant throughout the analysis. Values are means \pm SD from at least 15 determinations per data point using oocytes from two different frogs. #, $p < 0.05$ compared with wt oocytes by the Bonferroni method for multiple-range testing.

The analysis by LC-MS-MS of the ability of oocytes to carry out sulphonation, demonstrated that only 1.7% of the TLCA loaded was transformed into TSLCA (0.8 pmol/h/oocytes) (Figure 10). Therefore, when oocytes expressing ABCG2 were loaded with bile acids their efflux cannot be accounted for by the export of sulphated derivatives but of the unsulphated forms.

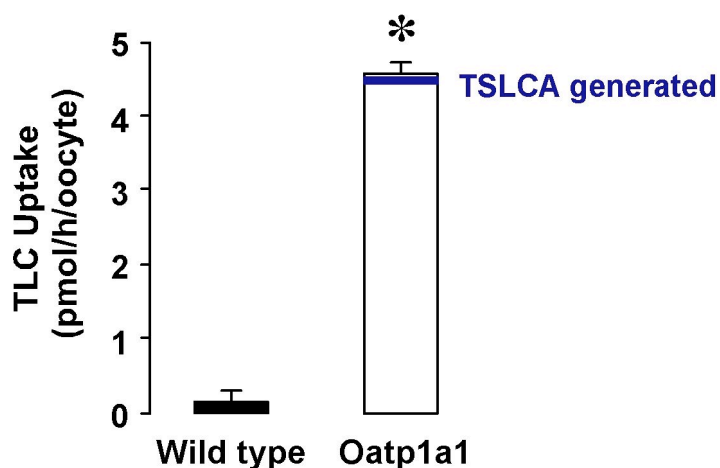


Figure 10. Sulphation of bile acids in *Xenopus laevis* oocytes. Oocytes expressing Oatp1a1 were incubated in the presence of 5 μ M taurochenodeoxycholic acid (TLCA) for 1 h at 25°C. TLCA content and the amount of TSLCA generated by the metabolism of the oocytes (in blue) was measured by LC-MS-MS. Values are means \pm SD from at least 5 determinations per data point. *, $p < 0.05$ as compared with wild-type oocytes by the paired t-test.

These results suggest that ABCG2 is able to transport primary bile acids and sulphated bile acids, which increase the broad spectrum of substrates transported by this pump.

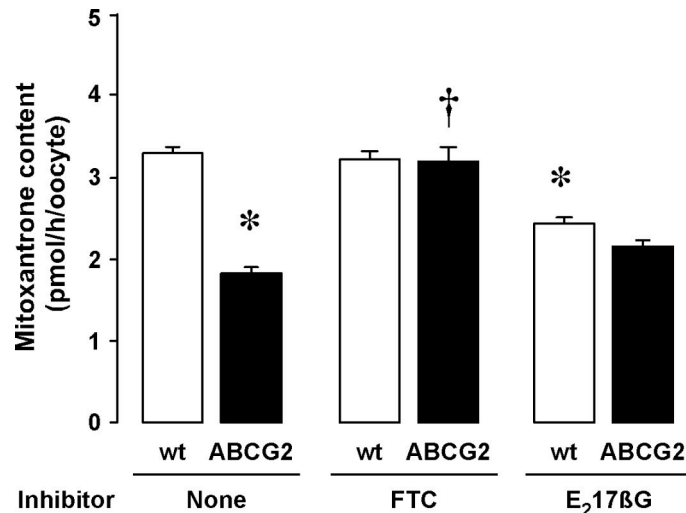
4.3. Effect of Estradiol 17 β -D-glucuronide (E₂17 β G) on ABCG2-mediated transport.

Several studies have demonstrated that sulphated steroids, but not E₂17 β G, inhibit ABCG2-mediated transport of drugs, such as MX, and physiological substrates, such as estrone sulphate (Imai et al., 2003; Imai et al., 2002). Moreover, it has been described that E₂17 β G is able to inhibit Bsep-mediated transport (Stieger et al., 2000; Vallejo et al., 2006).

The ability of this cholestatic steroid to affect ABCG2-mediated transport was investigated in *Xenopus laevis* oocytes.

Figure 11 shows MX accumulation was lower (~40%) in ABCG2-expressing oocytes than in wild-type cells. The addition of FTC completely reversed the effect. The presence of FTC in the uptake medium had no effect on MX content in control oocytes, while the addition of E₂17 β G significantly reduced the cell load. Moreover, in the presence of E₂17 β G, only a little reduction on MX content in ABCG2-expressing oocytes was observed. These results suggest that E₂17 β G probably interacts with ABCG2 producing a partial inhibition of the efflux of MX mediated by this pump.

Figure 11. Estradiol 17 β -D-glucuronide (E₂17 β G) effect on the transport of mitoxantrone in ABCG2-expressing oocytes (ABCG2). Cells were incubated in uptake medium containing 10 μ M [³H]-Mitoxantrone in the presence or absence of 5 μ M FTC or 50 μ M E₂17 β G at 25°C for 1 h. Results are means \pm SD from at least 30 determinations per data point using oocytes from three different frogs. *, $p < 0.05$ comparing with wild type (wt) oocytes by the paired t-test. †, $p < 0.05$ comparing ABCG2-expressing oocytes incubated with or without inhibitor by the paired t-test.



The sulphation of bile acids is enhanced during cholestasis (Makino et al., 1975). Figure 12 shows the effect of the cholestatic steroid E₂17 β G on the efflux of TSLCA by ABCG2-expressing oocytes preloaded by microinjection. We found an inhibitory effect on Bsep- and ABCG2-mediated TSLCA efflux when E₂17 β G was placed in the extracellular medium and also in the intracellular medium.

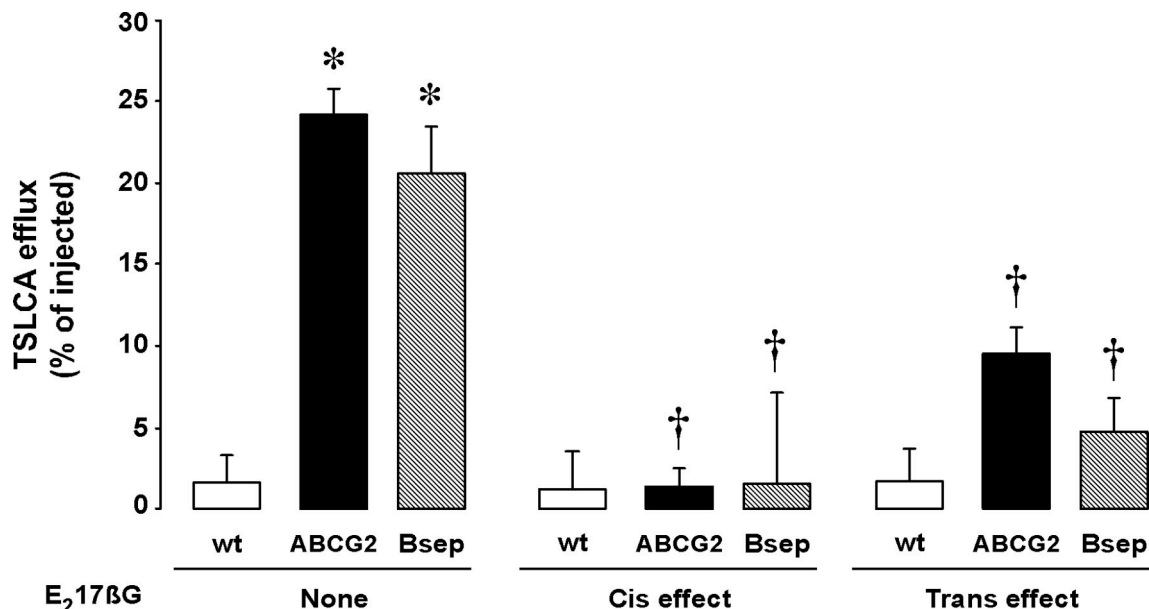


Figure 12. Effect of estradiol 17 β -D-glucuronide (E₂17 β G) on ABCG2-mediated efflux of taurolithocholic-3-sulfate acid (TSLCA) from *Xenopus laevis* oocytes previously loaded by microinjection. Oocytes expressing ABCG2, Bsep or wild-type (wt) cells were microinjected with 50 nl solution containing 150 μ M [¹⁴C]TSLCA alone or with 750 μ M E₂17 β G (cis effect) before being incubated with uptake medium alone or with 50 μ M E₂17 β G (trans effect) at

25°C for 1 h. Values are means \pm SD from at least 10 determinations per data point using oocytes from two different frogs. *, $p < 0.05$ compared with wt cells in the absence of E₂17 β G by the Bonferroni method for multiple-range testing; †, $p < 0.05$ comparing with efflux in the absence of E₂17 β G by the Bonferroni method for multiple-range testing.

Next, we decided to determine whether this steroid could be another substrate of the ABC pump. Figure 13 shows that E₂17 β G content in oocytes expressing Oatp1a1 is higher than in wild-type oocytes. The co-expression of ABCG2 and Oatp1a1 reduced the E₂17 β G content (-20%) compare with oocytes expressing Oatp1a1 alone.

The results indicate that this steroid is also a substrate of ABCG2, and this fact could explain its inhibitory effect on TSLCA-mediated transport by ABCG2.

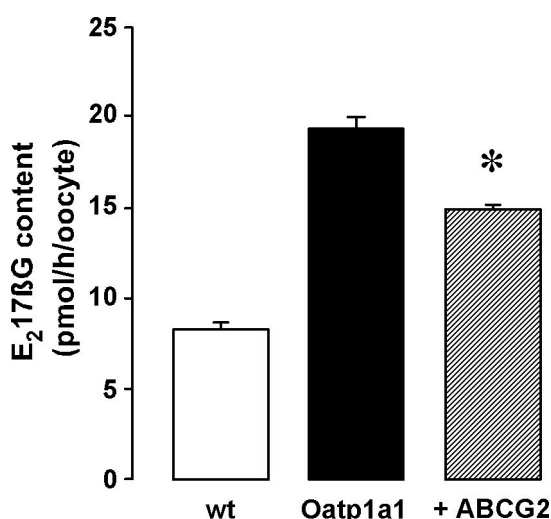


Figure 13. Estradiol 17 β -Dglucuronide (E₂17 β G) content in wild-type (wt) cells and Oatp1a1-expressing oocytes alone (Oatp1a1) or with ABCG2 (+ABCG2). Oocytes were incubated in uptake medium containing 10 μ M [³H]E₂17 β G (A) at 25°C for 1 h. Results are means \pm SD from at least 30 determinations per data point using oocytes from three different frogs. *, $p < 0.05$ by comparing with Oatp1a1-expressing oocytes by the paired t-test.

In conclusion, ABCG2 may play a role in the transport of bile acids. In the liver, ABCG2 might be an alternative route for bile acid secretion into bile when the expression and/or function of BSEP is impaired, but not when BSEP is inhibited by cholestatic steroids.

References

- Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y. 2001. Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511: 7-16.
- Aleksunes LM, Campion SN, Goedken MJ, Manautou JE. 2008a. Acquired resistance to acetaminophen hepatotoxicity is associated with induction of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4) in proliferating hepatocytes. *Toxicol Sci* 104: 261-73.

- Aleksunes LM, Scheffer GL, Jakowski AB, Pruimboom-Brees IM, Manautou JE. 2006. Coordinated expression of multidrug resistance-associated proteins (Mrps) in mouse liver during toxicant-induced injury. *Toxicol Sci* 89: 370-9.
- Aleksunes LM, Slitt AL, Maher JM, Augustine LM, Goedken MJ, Chan JY, Cherrington NJ, Klaassen CD, Manautou JE. 2008b. Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 226: 74-83.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16093-8.
- Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL. 1994. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 269: 17960-4.
- Bravo P, Bender V, Cassio D. 1998. Efficient in vitro vectorial transport of a fluorescent conjugated bile acid analogue by polarized hepatic hybrid WIF-B and WIF-B9 cells. *Hepatology* 27: 576-83.
- Briz O, Cassio D, Blazquez AG, Grosse B, Serrano MA, Marin JJ. 2007. Characterization of WIF-B9/R cells as an in vitro model with hepatocyte-like polarity and enhanced expression of canalicular ABC transporters involved in phase III of hepatic detoxification. *Toxicology* 232: 24-36.
- Briz O, Macias RI, Serrano MA, Gonzalez-Gallego J, Bayon JE, Marin JJ. 2003a. Excretion of foetal bilirubin by the rat placenta-maternal liver tandem. *Placenta* 24: 462-72.
- Briz O, Serrano MA, Macias RI, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. 2003b. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J* 371: 897-905.
- Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ. 2002. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123: 1649-58.
- Dalhoff K, Laursen H, Bangert K, Poulsen HE, Anderson ME, Grunnet N, Tygstrup N. 2001. Autoprotection in acetaminophen intoxication in rats: the role of liver regeneration. *Pharmacol Toxicol* 88: 135-41.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15665-70.
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. 1998. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273: 10046-50.
- Ghanem CI, Ruiz ML, Villanueva SS, Luquita M, Llesuy S, Catania VA, Bengochea LA, Mottino AD. 2009. Effect of repeated administration with subtoxic doses of acetaminophen to rats on enterohepatic recirculation of a subsequent toxic dose. *Biochem Pharmacol* 77: 1621-8.
- Gourley GR. 1997. Bilirubin metabolism and kernicterus. *Adv Pediatr* 44: 173-229.
- Hagenbuch B, Meier PJ. 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447: 653-65.
- Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. 2003. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol* 64: 610-8.
- Imai Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. 2002. Estrone and 17 β -estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance. *Jpn J Cancer Res* 93: 231-5.
- Janvilisri T, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L, van Veen HW. 2005. Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem J* 385: 419-26.
- Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. 2006. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2: 351-66.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D. 1997. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J* 327 (Pt 1): 305-10.

- Kawade N, Onishi S. 1981. The prenatal and postnatal development of UDP-glucuronyltransferase activity towards bilirubin and the effect of premature birth on this activity in the human liver. *Biochem J* 196: 257-60.
- Keppler D, König J, Buchler M. 1997. The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Adv Enzyme Regul* 37: 321-33.
- Kitamura T, Gatmaitan Z, Arias IM. 1990. Serial quantitative image analysis and confocal microscopy of hepatic uptake, intracellular distribution and biliary secretion of a fluorescent bile acid analog in rat hepatocyte doublets. *Hepatology* 12: 1358-64.
- Knudsen A, Lebech M. 1989. Maternal bilirubin, cord bilirubin, and placenta function at delivery and the development of jaundice in mature newborns. *Acta Obstet Gynecol Scand* 68: 719-24.
- Macias RI, Pascual MJ, Bravo A, Alcalde MP, Larena MG, St-Pierre MV, Serrano MA, Marin JJ. 2000. Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology* 31: 975-83.
- Makino I, Hashimoto H, Shinozaki K, Yoshino K, Nakagawa S. 1975. Sulfated and nonsulfated bile acids in urine, serum, and bile of patients with hepatobiliary diseases. *Gastroenterology* 68: 545-53.
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61: 3458-64.
- Marin JJ, Macias RI, Serrano MA. 2003. The hepatobiliary-like excretory function of the placenta. A review. *Placenta* 24: 431-8.
- McCoubrey WK, Jr., Cooklis MA, Maines MD. 1995. The structure, organization and differential expression of the rat gene encoding biliverdin reductase. *Gene* 160: 235-40.
- McDonagh AF, Palma LA, Schmid R. 1981. Reduction of biliverdin and placental transfer of bilirubin and biliverdin in the pregnant guinea pig. *Biochem J* 194: 273-82.
- McLean M, Bowman M, Clifton V, Smith R, Grossman AB. 2000. Expression of the heme oxygenase-carbon monoxide signalling system in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2345-9.
- Monte MJ, Rodríguez-Bravo T, Macias RI, Bravo P, el-Mir MY, Serrano MA, Lopez-Salva A, Marin JJ. 1995. Relationship between bile acid transplacental gradients and transport across the fetal-facing plasma membrane of the human trophoblast. *Pediatr Res* 38: 156-63.
- Muller M, Mayer R, Hero U, Keppler D. 1994. ATP-dependent transport of amphiphilic cations across the hepatocyte canalicular membrane mediated by mdr1 P-glycoprotein. *FEBS Lett* 343: 168-72.
- Pascual MJ, Serrano MA, El-Mir MY, Macias RI, Jimenez F, Marin JJ. 2002. Relationship between asymptomatic hypercholanemia of pregnancy and progesterone metabolism. *Clin Sci (Lond)* 102: 587-93.
- Patel P, Weerasekera N, Hitchins M, Boyd CA, Johnston DG, Williamson C. 2003. Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta* 24: 39-44.
- Perez MJ, Macias RI, Duran C, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ. 2005. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 43: 324-32.
- Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM. 2000. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 60: 47-50.
- Ryter SW, Tyrrell RM. 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28: 289-309.
- Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. 2002. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99: 507-12.
- Schmid R. 1976. The distinguished lecture: Pyrrolic victories. *Trans Assoc Am Physicians* 89: 64-76.

- Serrano MA, Bayon JE, Pascolo L, Tiribelli C, Ostrow JD, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. 2002. Evidence for carrier-mediated transport of unconjugated bilirubin across plasma membrane vesicles from human placental trophoblast. *Placenta* 23: 527-35.
- Serrano MA, Brites D, Larena MG, Monte MJ, Bravo MP, Oliveira N, Marin JJ. 1998. Beneficial effect of ursodeoxycholic acid on alterations induced by cholestasis of pregnancy in bile acid transport across the human placenta. *J Hepatol* 28: 829-39.
- Shayiq RM, Roberts DW, Rothstein K, Snawder JE, Benson W, Ma X, Black M. 1999. Repeat exposure to incremental doses of acetaminophen provides protection against acetaminophen-induced lethality in mice: an explanation for high acetaminophen dosage in humans without hepatic injury. *Hepatology* 29: 451-63.
- Sherman IA, Fisher MM. 1986. Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy. *Hepatology* 6: 444-9.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ. 2000. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1495-503.
- Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. 2000. Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118: 422-30.
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. 2003. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* 278: 22644-9.
- Vallejo M, Briz O, Serrano MA, Monte MJ, Marin JJ. 2006. Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol* 44: 1150-7.
- Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M. 2006. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* 3: 231-51.

CONCLUSIONS

First conclusion

The human placenta expresses several proteins belonging to the OATP and ABC families of transporters involved in the hepatic transport of cholephilic organic anions. However, important differences between liver and placenta were found. Thus, under physiological circumstances, MRP1, MRP3, MRP4 and BCRP are weakly expressed in the liver, whereas they are abundant in placenta. In contrast, the main bile acid export pump in the liver, BSEP, is scarcely expressed in the placenta.

Second conclusion

In human placenta OATP1B1 and OATP1B3 have been found localized in the endothelium of the fetal capillaries, which suggests that they participate in the placental uptake of organic anions from fetal blood.

Third conclusion

Human choriocarcinoma cell lines BeWo, JAr and Jeg-3 are good *in vitro* models to study different aspects of placental physiology and pharmacology because of the marked similarity in the expression levels of organic anions transporters and nuclear receptors with those found in human trophoblast at term. Moreover, these cells can respond to the presence in the medium of potentially toxic compounds by over-expressing several export pumps.

Fourth conclusion

Several OATPs, in particular Oatp1a1, is involved in the uptake of fetal biliverdin by the rat placenta. Once in the placenta, and before being transferred to the mother, biliverdin is extensively converted into bilirubin by biliverdin reductase alpha, which is highly expressed in this organ.

Fifth conclusion

Using WIF-B9/R cells, which are polarized cells over-expressing BCRP, the role of this ABC pump in the vectorial hepatobiliary transport of cholephilic compounds, such as the fluorescent bile acid derivative cholyglycylamidofluorescein, has been demonstrated.

Sixth conclusion

Co-expression of ABC pumps and OATP proteins in *Xenopus laevis* oocytes can be used as a useful model to determine uptake-efflux processes mediated by OATP and ABC transporters, respectively.

Seventh conclusion

Primary bile acids (either free, conjugated or sulphated), and the cholestatic steroid estradiol 17 β -D-glucuronide can be recognized as substrates by BCRP. In addition, estradiol 17 β -D-glucuronide is able to cis-inhibit and trans-inhibit human BCRP and rat Bsep.

Final conclusion

Several cholephilic organic anion transporters belonging to the ABC and OATP families of proteins have been identified and localized in human placenta. They can participate in the excretory and barrier functions of the placenta. The ability of BCRP to transport several bile acids has been demonstrated. Moreover, in the present study, proteins (transporters and enzymes) involved in placental transfer of biliverdin/bilirubin have been characterized.

Expression in Human Trophoblast and Choriocarcinoma Cell Lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of Genes Involved in the Hepatobiliary-like Excretory Function of the Placenta[☆]

M.A. Serrano^a, R.I.R. Macias^b, O. Briz^b, M.J. Monte^b, A.G. Blazquez^b,
C. Williamson^c, R. Kubitz^d, J.J.G. Marin^{b,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, Salamanca, Spain

^b Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E.D. S-09, 37007-Salamanca, Spain

^c Imperial College School of Science, Technology and Medicine, Institute of Reproductive and Developmental Biology, Hammersmith Campus, London, UK

^d Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectiology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

Accepted 15 March 2006

Abstract

Using cytokeratin-7-positive trophoblast cells (hTr) isolated from human term placentas and the choriocarcinoma cell lines (hCC) BeWo, Jeg-3 and JAr, the expression of genes involved in the hepatobiliary excretion of cholephilic compounds was investigated by RT-PCR/sequencing followed by measurement of the absolute abundance of mRNA by real-time RT-PCR. Although mRNA of BSEP was detectable and its expression confirmed by Western blotting, its very low expression (higher in hTr than in whole placenta and hCC) did not permit its detection by immunohistochemistry. In hTr, the expression was high for OATP-B/2B1, OATP-8/1B3, MRP1, MRP3, BCRP, FIC1, RAR α , FXR and SHP, low for OST α , MRP2, MRP4, MRP8, MDR1, CAR and SXR, very low for OATP-A/1A2 and MDR3, and not detectable for OATP-C/1B1, HNF1 α and HNF4. Expression patterns in hCC mimicked those in hTr, although some important cell line-specific differences were found. The functionality of transporters expressed in hCC was confirmed by their ability to take up and export estradiol 17 β -D-glucuronide in a self-inhibitable and temperature-sensitive manner. In conclusion, several transporters, export pumps, and nuclear receptors involved in the liver excretory function may play a similar role in the placenta, whose specific aspects can be studied by selectively using BeWo, Jeg-3 or JAr cells. © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: ABC proteins; Bile acid; Carrier; Liver; Nuclear receptors; OATP; Pregnancy

1. Introduction

The placenta plays a crucial role transferring a large variety of substances, including oxygen, nutrients, vitamins, hormones, etc., from the mother to the fetus. On the other hand, owing to the immaturity of the fetal liver, the placenta also constitutes the main route of elimination of potentially toxic compounds produced by fetal metabolism, such as cholephilic compounds, so-called because they are efficiently eliminated in bile by the liver in the adult. These compounds include bile acids and biliary pigments, which are synthesized by the fetal liver from very early on in gestation [1], and hence they must be transferred toward the maternal blood across the placenta [2].

Abbreviations: BCRP, breast cancer resistance protein; BSEP, bile salt export pump; E₂17 β G, estradiol 17 β -D-glucuronide; hCC, human choriocarcinoma cells; hTr, human primary trophoblasts; MDR, multidrug resistance protein; MRP, multidrug resistance-associated protein; OATP, organic anion-transporting polypeptide; OST, organic solute transporter.

[☆] **Financial support:** This study was supported in part by the “Junta de Castilla y León (Grant SA013/04)”, Spain and the “Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Grant BFI2003-03208)”, Spain. Some of the authors are members of the Network for Cooperative Research on Hepatitis, Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grant G03/015), Spain.

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294674; fax: +34 923 294669.

E-mail address: jjgmarin@usal.es (J.J.G. Marin).

The vectorial characteristics of the overall mechanisms involved in the hepatobiliary-like excretory role of the placenta [3] also constitute a barrier that provides protection for the *conceptus* against any potentially toxic endogenous compounds or xenobiotics that may reach the maternal side of the placenta [4]. In addition to the transport machinery, the placental barrier also includes enzymes able to perform many different detoxification reactions [5].

The trophoblast constitutes the outermost layer of the chorionic villi and is a key element in the placental barrier. Understanding the role of the uptake and export transporters involved in the excretory function of the trophoblast and the mechanisms of regulation of these proteins is crucial for evaluating the level of protection afforded by the placenta to the fetus and for elucidating the potential pharmacological usefulness or toxicological danger of drugs and other xenobiotics.

In light of the above, the present study was undertaken following two lines of interest: (i) to gain insight into the molecular bases of the mechanisms involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta and, (ii) to characterize three choriocarcinoma cell lines as potentially suitable “*in vitro*” models for use in further studies addressing the regulation of the expression and function of the plasma membrane transporters involved in this aspect of the physiology and pharmacology of the placenta.

In this respect, several commercially available immortalized trophoblast cell lines, including BeWo, Jeg-3 and JAr, have been previously used as models for studying the transport/barrier function of the placenta. These lines were established from human choriocarcinoma cells (hCC) derived from first trimester trophoblast. The similarities between hCC and trophoblast support the use of these cells as valid and suitable models to study different aspects of trophoblast physiology and pharmacology. This is of particular interest in view of the difficulty involved in obtaining large amounts of freshly isolated trophoblast cells [6].

In spite of similarities among these hCC in several aspects — they are able to synthesize chorionic gonadotropin and steroids — they differ markedly in other characteristics, such as their proliferative activity and degree of differentiation. Thus, BeWo and JAr cells are less differentiated than Jeg-3 cells, but they have higher rates of proliferation [6–8]. Therefore, in order to use them in further investigations it is important to characterize their expression pattern of the transporters and nuclear receptors involved in the hepatobiliary-like excretory role of the placenta, because this information will be useful to decide which cell line should be chosen in each case to carry out future studies on particular aspects of this placental function.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Porcine pancreas trypsin, ethylene diamino tetra-acetic acid (EDTA), Percoll, and density marker beads were purchased from Sigma–Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). Dispace II and DNase I were purchased from Roche (Barcelona, Spain). [6,7-³H]-estradiol 17 β -D-glucuronide ([³H]-E₂17 β G,

40.5 μ Ci/nmol) was from NEN (Pacisa + Giralt, Madrid, Spain). All other chemicals were obtained from Merck (Barcelona, Spain) or Sigma–Aldrich.

2.2. Isolation of human trophoblast cells

Isolated trophoblast cells (hTr) were purified from 12 human term placentas obtained after spontaneous vaginal delivery or uncomplicated caesarean sections at the Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Salamanca, Spain, in accordance with the protocols and consent forms approved by the Human Subjects Committee of this hospital. To obtain hTr, a combination of previously described methods [9–11] was used, as previously described in detail [12]. Total cell numbers were counted using a haemocytometer. Viability, as determined by Trypan Blue exclusion, was found to be higher than 97%. An aliquot of the preparation was fixed on glass slides and stained immunohistochemically using monoclonal mouse anti-human cytokeratin-7 (Novocastra, Atom, Barcelona, Spain) as primary antibody. As secondary antibody, we used either Vectastain ABC peroxidase kit (Vector Laboratories, Peterborough, UK) or Alexa Fluor® 594 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) to count cytokeratin-7-positive cells by light microscopy or to carry out fluorescence studies, respectively. Typically, 85–90% of the purified hTr did stain immunologically for cytokeratin-7 (Fig. 1A).

2.3. Human choriocarcinoma cell lines

Human choriocarcinoma cell lines (hCC), BeWo (CCL-98; passage 190), Jeg-3 (HTB-36; passage 28) and JAr (HTB-144; passage 35) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). BeWo cells were cultured in F-12 medium (Invitrogen, Barcelona, Spain), Jeg-3 cells in DMEM (Sigma–Aldrich) and JAr in RPMI 1640 (Sigma–Aldrich), all of them containing 10% FCS (TDI S.A., Madrid, Spain) and 1% antibiotic–antimycotic solution (Sigma–Aldrich) and other supplements as reported by the supplier.

These hCC were cultured for 9 days in T-25 Roux flasks in the appropriate medium for each cell line. They were doubled every 2–3 days, i.e., when they reached subconfluence. For studies of gene expression, hCC were harvested by exposure to trypsin–EDTA solution and then pelleted by centrifugation at 250 \times g for 10 min. The cells were washed once with PBS and pelleted again to proceed with total RNA extraction.

2.4. Functional studies

To carry out transport studies in hCC, 2×10^5 cells were plated in the appropriate medium in 3 cm diameter Petri dishes and then cultured for 2–3 days until they reached subconfluence. Cells were rinsed with substrate/inhibitor-free medium (116 mM choline chloride, 5.3 mM KCl, 1.1 mM KH₂PO₄, 1.8 mM CaCl₂, 11 mM D-glucose, 10 mM Hepes/Tris, pH 7.4) and subsequently preincubated for 40 min with a similar medium containing 116 mM NaCl instead of choline chloride and then incubated with choline medium but this time containing the desired concentrations of [³H]-E₂17 β G with or without unlabeled E₂17 β G at the temperature and for the time indicated for each experimental condition.

In efflux experiments, the cells were previously loaded with 5 μ M substrate at 37 °C for 60 min and then incubated with substrate-free medium at 4 °C or 37 °C. Uptake and efflux processes were stopped by rinsing the culture dishes four times with 2 ml ice-cold substrate-free uptake medium. Cells were digested with Lowry solution and their radioactivity content measured in a LS 6500 scintillation counter (Beckman Instruments, Madrid, Spain). The results were corrected by the amount of protein present in each dish [13].

2.5. Determination of gene expression

Total RNA was isolated from hTr, hCC and healthy human liver tissue. The latter was collected at the same hospital, following the same ethical protocol as above described for placentas. RNeasy spin columns from QIAGEN (Izasa, Barcelona, Spain) were used. The samples were treated with DNase I, and

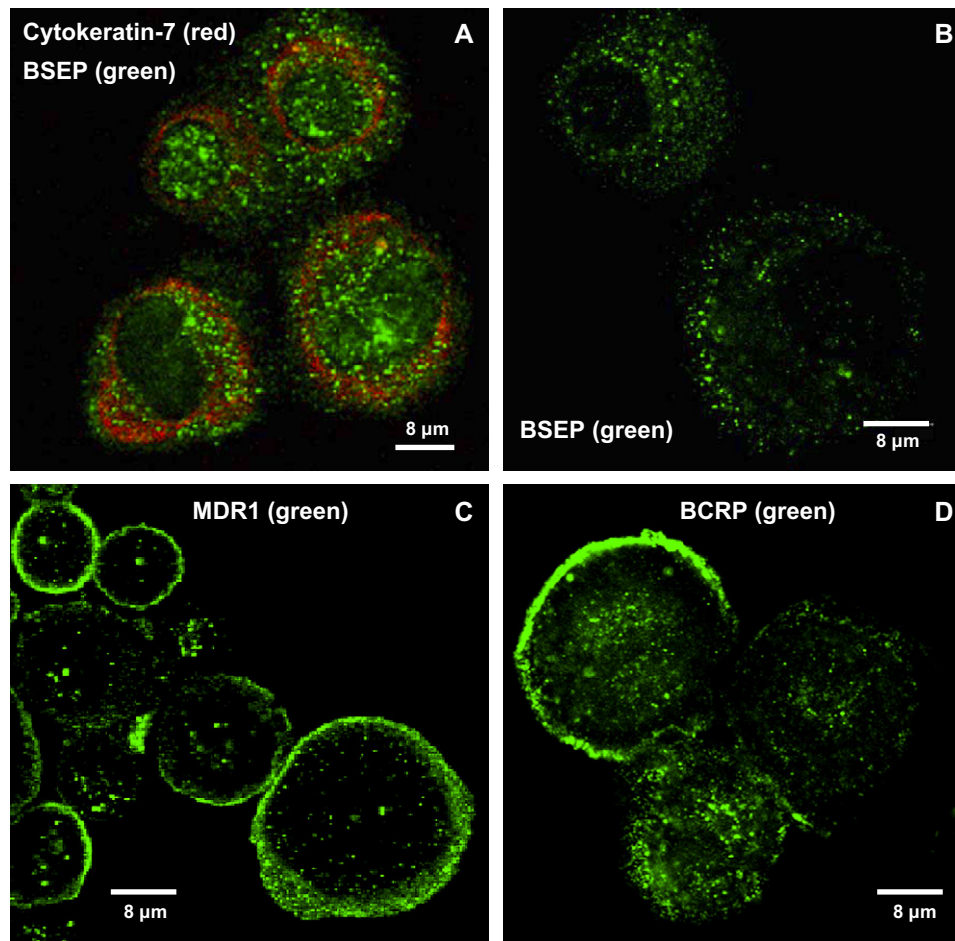


Fig. 1. Representative images of trophoblast cells isolated from human term placenta after immunostaining with primary antibodies against the proteins indicated below. (A) Cytokeratin-7 (red) and BSEP (green). (B) BSEP (green). (C) MDR1 (green). (D) BCRP (green).

the amount of RNA measured with the RiboGreen RNA-Quantitation kit (Molecular Probes). RT was carried out using random nonamers and the Enhanced Avian RT-PCR kit (Sigma-Genosys, Cambridge, UK).

The expression in placental cells of the selected genes was investigated by conventional PCR with gene-specific oligonucleotide primers (Table 1) and hot-start PCR DNA polymerase (AmpliTaq Gold Polymerase, Applied

Biosystems, Madrid, Spain). Oligonucleotide sequences of primers were designed with the assistance of Primer Express software (Applied Biosystems) for cDNA fragments in described sequences, and their specificity was checked using BLAST. After 40 cycles, the amplified mid-size fragments were purified by agarose gel electrophoresis, extracted, and subsequently sequenced (ABI PRISM® 3100, Applied Biosystems).

Table 1
Gene-specific primers used for PCR analysis and sequencing

Name (Gene)	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Product size (bp)	Sequence similarity	Accession number
OATP-A/1A2 (<i>SLCO1A2</i>)	GTCAAACAAGCTGCCACAT	TATCCAGGTATGGCAGCCAAA	445	100%	NM_021094
OATP-B/2B1 (<i>SLCO2B1</i>)	AGCTCCCACCGTTATTGCAT	AGGATAGCCCCATAGCCAATC	514	100%	NM_007256
OATP-C/1B1 (<i>SLCO1B1</i>)	TGTCTTTGCATGTGCTGGAAA	TTGCCACTTGAAGATTGCAAC	604	N.D.	NM_006446
OATP8/1B3 (<i>SLCO1B3</i>)	CTGCAATGGATTCAAGATGTTCTT	TGCAAAGCCAATGACTGGAC	607	100%	NM_019844
BSEP (<i>ABCB11</i>)	TGCTGAACATCGAGAGCGAAA	TGAGACACCACACGAATCCAGT	606	99%	NM_003742
MRP1 (<i>ABCC1</i>)	CGACATGACCGAGGCTACATT	TCAACCCTGTGATCCACCAGA	508	99%	NM_004996
MRP2 (<i>ABCC2</i>)	GGATAATCAGCACCTTGTCTATG	ACTCAGTTATTCGCTCAACAGCC	500	99%	NM_000392
MRP3 (<i>ABCC3</i>)	CGGCACGACACAAGGCTTC	CCGTTGAGTGGAATCAGCAAG	600	99%	AF085690
MRP4 (<i>ABCC4</i>)	GGACAGGCGTGGCGG	AGAGGATCGTCCAGGAGATAGATG	1800	98%	NM_005845
MRP8 (<i>ABCC11</i>)	AGGAGAGCCTCCCGGTGTATT	CAACTCAAGGAGCCTTCTTCCA	2447	98%	NM_032583
BCRP (<i>ABCG2</i>)	GCCTCTATTAAAGCTGAAAAGATAA	GAATACTTCAATCAAAGTGCTTC	2074	99%	BC021281
Beta-actin	GCGGGAAATCGTGCGTGACAT	GGGGGCACGAAGGCTCATCATT	979	N.D.	X00351

RT-PCR/sequencing was carried out using total RNA from cytochrome-7-positive trophoblast cells isolated from human placenta. The sequence of the region of the amplified fragments (≥ 300 bp), where no uncertainties were detected, was compared with the sequence corresponding to the accession number and the result is expressed as percent of similarity. N.D., not determined.

Table 2
Gene-specific primers used for quantitative real-time RT-PCR analysis

Name	(Gene)	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Product size (bp)	Accession number
OATP-A/1A2	(<i>SLC01A2</i>)	AAGACCAACGCAGGATCCAT	GAGTTTCACCCATTCACGTACA	101	NM_021094
OATP-B/2B1	(<i>SLC02B1</i>)	CCCAGCACTCGTGGAATA	GCACGTTGAGTCGCAGGAT	156	NM_007256
OATP-C/1B1	(<i>SLC01B1</i>)	GAATGCCCAAGAGATGATGCTT	AACCCAGTGCAAGTGATTCAAT	154	NM_006446
OATP8/1B3	(<i>SLC01B3</i>)	GTCCAGTCATTGGCTTTGCA	CAACCCAACGAGAGTCCTTAGG	111	NM_019844
OST α	(<i>MGC39807</i>)	TGTCCACACTGCTGGCTCTCT	GGCTCCCATGTTCTGCTCAC	83	NM_152672
MDR1	(<i>ABCB1</i>)	GCCTACTTGGTGGCACATAAAC	GCACCAAAGACAACAGCTGAAA	74	NM_000927
MDR3	(<i>ABCB4</i>)	TGATGTGGAACCGATGGACT	CATCATCGCCTGGTCCAAA	191	NM_000443
BSEP	(<i>ABCB11</i>)	ATAAGTGGAACTGCTGCTTAGAGT	GGAGGTTTCGTGCACCAGGTA	107	NM_003742
MRP1	(<i>ABCC1</i>)	CCGCAGATCTTAAAGTTGCTCA	TGCCACTGACGAAGCAGATG	151	NM_004996
MRP2	(<i>ABCC2</i>)	GGCAGTGAAGAAGAAGACGATGA	ATTGGACCTAGAAGTGCAGGCT	133	NM_000392
MRP3	(<i>ABCC3</i>)	TCTGTCTGGCTGGAGTCG	TCAGCTTGATGCGCGAGTC	121	AF085690
MRP4	(<i>ABCC4</i>)	AATGTGACCGTCCATCCTCC	AGGTTTGGCCTTCTTGGGA	101	NM_005845
MRP8	(<i>ABCC11</i>)	CGGTCTCCTTTATTCTCCCACA	AGCCTCTTAAACTGGCTGATGAAGT	101	NM_032583
BCRP	(<i>ABCG2</i>)	TTAAGTGGAACTGCTGCTTAGAGT	TCGGTCTTAACCAAAGGCTCA	134	BC021281
FIC1	(<i>ATP8B1</i>)	GGGCGTCACTGCAATCAAA	TTTGAACCTGCCATCCTTAATGA	106	NM_005603
FXR	(<i>NR1H4</i>)	TCTCCTGGGTGCGCTGACT	ACTGCACGTCCCAGATTTCAC	122	NM_005123
CAR	(<i>NR1I3</i>)	AGAGCTGATCCGGACACTCCT	GGAGGCCTAAACTGCACAAACT	81	BC069651
RAR α	(<i>NR1B1</i>)	ACCGGGACAAGAACTGCATC	TTGGACATGCCCACTTCAAA	91	NM_001033603
HNF1 α	(<i>TCF1</i>)	CCTGTCCCAACACCTCAACAA	TTGAAACGGTTCTCTCCGC	186	NM_000545
HNF4	(<i>NR2A1</i>)	AAGAGGAACCAAGTGCCGCTA	CGCATTGATGGAGGGCAG	141	X87870
SHP	(<i>NR0B2</i>)	GGCTTCAATGCTGTCTGGAGT	CCCTTTCAGGCAGGCATATT	71	NM_021969
SXR	(<i>NR1I2</i>)	GCCCAAGTGTAACGCAGAT	GGCCCTCCTGAAAAAGCC	127	NM_003889

To determine the absolute abundance of mRNA, real-time quantitative PCR (ABI PRISM® 5700 Sequence Detection System, Applied Biosystems) was performed using the primer oligonucleotides listed in Table 2. Detection of amplified products was carried out using SYBR Green I. The absence of non-specific amplified products, as detected by 2.5% agarose gel electrophoresis or melting temperature curves, was confirmed in all cases, except for MRP1, MRP3 and BSEP. In these cases, detection was carried out using the Taqman® probes with the following oligonucleotide sequences: MRP1, ACCGTGCTGCTGTTTGTCTACTGCC; MRP3, TGGCCGTGAAGATGCGC and BSEP, CCATCCGGCAACGCTCCAAGTCT.

Calculation was carried out using standard curves generated by plotting the threshold cycle (Ct) versus log of the copy number of cDNA fragments obtained by conventional PCR and quantified with the PicoGreen detection kit (Molecular Probes). Primer oligonucleotides were provided by Sigma-Genosys or Applied Biosystems. Measurements were carried out in triplicate using cDNA from four different RT reactions. Values were corrected by the amount of 18S rRNA in each sample, which was measured with the TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents kit (Applied Biosystems). Abundance of this rRNA was quite similar in all cells studied here. Thus, mean Ct values were hTr = 12.22, BeWo = 12.46, Jeg-3 = 12.15 and JAr = 12.80.

2.6. Protein detection

Immunofluorescence studies were carried out using hCC cultured on Lab-Tek chamber slides (BD, Madrid, Spain) for 72 h and freshly isolated hTr that were concentrated on slides by centrifugation at 400 rpm for 7 min with a Shandon Cytospin® (Thermo, Hucos-Erlross, Madrid, Spain). The cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline for 15 min, permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 3 min, and non-specific binding sites were blocked by incubation with 10% FCS for 30 min. Before the addition of primary antibodies, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Preparations were incubated at room temperature for 1 h with the desired primary antibody from Alexis Biochemicals (Pacifica + Giralto) diluted in 5% FCS in PBS (MRP6 diluted 1:20 for MRP1; M₃ II-9 diluted 1:50 for MRP3; C494 diluted 1:100 for MDR1 and BXP-34 diluted 1:50 for BCRP). For BSEP, rabbit polyclonal antibody (K168) diluted 1:25 was used [14]. After washing three times with PBS, cells were incubated for 1 h with 1:1000 dilution of the appropriate Alexa fluor-conjugated secondary antibody

(anti-rabbit or anti-mouse IgG Alexa 488 from Molecular Probes) and propidium iodide (1 µg/ml) to stain nuclei. After washing three times with PBS, Slowfade Light Antifade Reagent (Molecular Probes) was used as mounting medium. Negative controls were performed by omitting the primary antibodies.

Immunohistochemical analysis was also performed on 5-µm-thick frozen sections of human liver biopsies or term placentas fixed in cold acetone. After blocking, specimens were labeled with primary antibody, rinsed with PBS and incubated with Alexa 488- or 594-conjugated secondary antibodies. Fluorescence staining was visualized using a TCS SP2 laser-scanning confocal apparatus (Leica Microsystems, Barcelona, Spain).

Crude plasma membrane preparations from human liver (30 µg), placenta (250 µg) or hTr (250 µg) were subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting as described [15]. The blots were probed with the monoclonal antibody USal-hBSEP-McAb-1 against BSEP (Alexis Biochemicals) diluted 1:50.

2.7. Statistical analysis

Results are means ± S.D. of measurements carried out in triplicate in four separate experiments. A two-way ANOVA was used to calculate the statistical significance of the differences.

3. Results

3.1. Expression of BSEP in human trophoblast

To elucidate the expression of genes involved in hepatobiliary function in human trophoblast, the presence of mRNA for a panel of selected proteins was investigated in placental cells by conventional PCR, followed by sequencing (Table 1) of the cDNA recovered from an agarose gel after electrophoretic separation. Although the expression in human placenta or hCC of some of the proteins studied here has been already reported, we have included them in the present study to have a complete panel for comparison purposes. The values of sequence

identity for amplified fragments of DNA obtained by RT-PCR from hTr (Table 1) were similar to those found for similar fragments obtained from all hCC assayed (data not shown).

Owing to that BSEP plays a major role in bile acid transport across hepatocytes, special interest was paid here to investigate the expression of this pump in placental cells. The mRNA of BSEP was detectable at low level in hTr. Sequencing of the amplified fragment in hTr and liver revealed 99% similarity between them. Determination of the abundance of mRNA revealed that this was higher in hTr (Table 3) than in whole placenta (0.8 copies/10⁶ copies 18S rRNA), but still very low as compared with the liver (Table 3). Moreover, in hCC this was low (JAR), very low (Jeg-3) or not detectable (BeWo).

To detect this protein, two different antibodies were used, depending on their suitability for Western blot or immunohistochemistry. A band of anti-BSEP antibody-reactive protein of similar size was seen in membranes from liver, hTr and chorionic tissue upon analysis by Western blot (Fig. 2). In agreement with results of mRNA abundance, the intensity of these bands was liver >> hTr > chorionic tissue. The abundance of this protein in the canalicular plasma membrane permitted

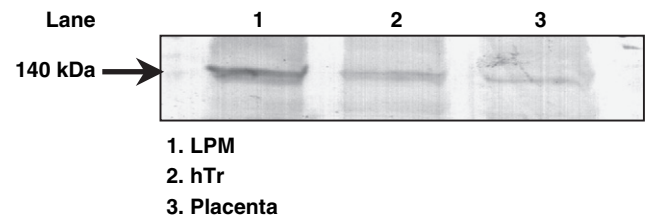


Fig. 2. Representative images of Western blot analysis carried out with crude membrane preparations obtained from human liver (lane 1), cytochrome-7-positive trophocytes isolated from human placentas (lane 2), and human chorionic tissue at term (lane 3). Detection was carried out using USal-hBSEP-McAb-1 antibody against BSEP.

its detection by immunohistochemistry in human liver slices (Fig. 3), but the expression level in the plasma membrane of chorionic tissue, hTr and hCC was not enough to detect BSEP by this technique (Figs. 1 and 3). As positive controls, both MDR1 and BCRP were clearly observed by immunohistochemistry in the plasma membrane of hTr (Fig. 1). BCRP was also clearly seen in the bile canaliculi (Fig. 3A); the surrounding surface of the chorionic villi, i.e. the apical membrane of the trophoblast (Fig. 3C), and in the plasma membrane of hCC. Since similar negative results for BSEP expression were obtained in Jeg-3, BeWo and JAR cells, only one of them – Jeg-3 – is shown for the sake of simplicity (Fig. 3E and F).

In contrast, BCRP was clearly detected in the plasma membrane of the three cell lines studied here (Fig. 4A), whereas MDR1 was also present but at low levels (Fig. 4B), which was consistent with values of absolute abundance of mRNA for both proteins (Table 3).

3.2. Transcriptional profile of transporters

Qualitative and quantitative PCR analyses revealed the expression of OATP-A/1A2, OATP-B/2B1, OATP8/1B3 and OSTα but not OATP-C/1B1 in hTr and hCC (Table 3). Regarding export pumps other than BSEP, the mRNA of MRP1 was more abundant in both hTr and hCC than in liver; MRP2 mRNA was detected in liver at higher levels than in hTr and hCC. MRP3 was similarly expressed in liver and hTr but its expression in hCC was very poor. The expression of MRP4 and MRP8 was very low in liver and hTr, but both were more expressed in hCC. BCRP mRNA was more abundant in hTr and hCC than in liver. The expression of MDR1 was similar in liver, hTr and hCC. In contrast to the liver, the expression of MDR3 in hTr and hCC was barely detectable. By contrast, the abundance of FIC1 mRNA was higher in hTr and hCC (in particular JAR) than in liver.

3.3. Transcriptional profile of nuclear receptors and transcription factors

Measurement of steady-state levels of mRNA for the nuclear receptors involved in controlling the expression of the above transporters revealed that some of them were not detectable (HNF1α, hepatocyte nuclear factor-1α and HNF4,

Table 3
Steady-state values of absolute abundance of mRNA

	mRNA copies/10 ⁶ copies 18S rRNA				
	Liver	hTr	BeWo	Jeg-3	JAR
<i>Organic anion carriers</i>					
OATP-A/1A2	5.2	0.4	11	20	54
OATP-B/2B1	256	226	21	16	34
OATP-C/1B1	494	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OATP8/1B3	159	31	66	10	618
OSTα	143	5.1	16	166	43
<i>Export pumps</i>					
BSEP	983	6	N.D.	0.7	3
MRP1	4.5	46	61	67	45
MRP2	123	3.8	13	5.6	26
MRP3	177	184	1.3	1.1	0.9
MRP4	11	13	29	61	24
MRP8	5.1	3.5	11	30	12
BCRP	10	81	434	138	358
MDR1	15	15	19	8	18
MDR3	71	0.3	0.5	0.3	0.4
FIC1	39	208	312	157	1285
<i>Nuclear receptors</i>					
SXR	387	10	12	4.2	48
FXR	393	245	516	79	679
SHF	41	74	145	32	810
CAR	81	3.5	9.6	57	26
RARα	18	19	12	120	24
HNF1α	15	N.D.	2.5	0.3	3.1
HNF4	11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Values of absolute abundance of mRNA as determined by real-time quantitative RT-PCR in adult human liver, cytochrome-7-positive human trophoblast cells (hTr) isolated from human placenta at term, and three human choriocarcinoma cell lines: BeWo, Jeg-3 and JAR. Values are means from measurements carried out in triplicate using cDNA from four different RT reactions corrected by the amount of 18S rRNA in each sample. Values of S.D. (not shown) were less than 10% of the means. N.D., not detectable. The lowest limit of linear detection was 0.1 mRNA copies/10⁶ copies 18S rRNA.

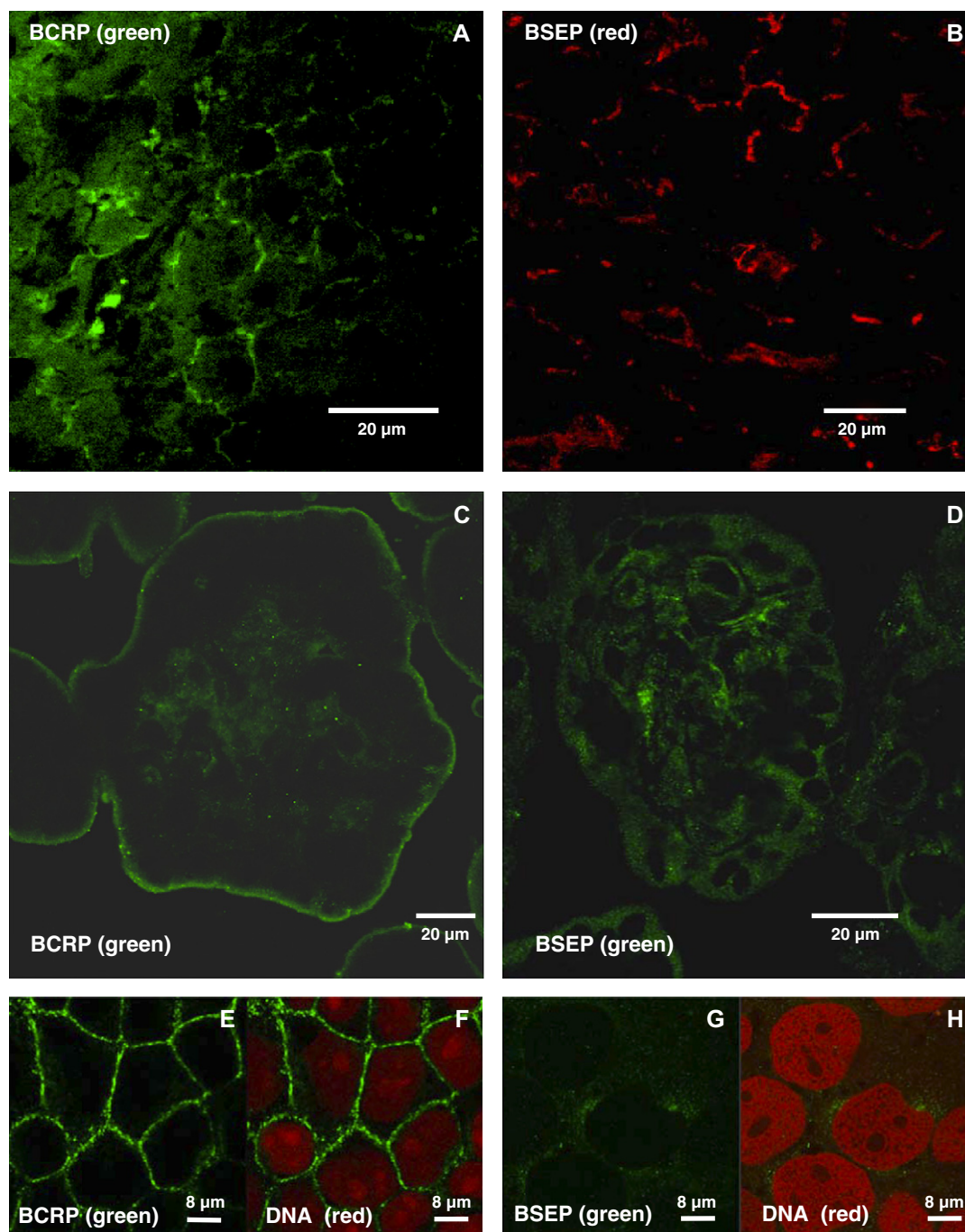


Fig. 3. Representative immunolocalization images of BCRP (A, C, E and F) and BSEP (B, D, G and H) in human liver (A and B), human chorionic villi (C and D), and human choriocarcinoma Jeg-3 cells (E, F, G and H). In figures F and H the nuclear DNA was stained red with propidium iodide to identify individual cells.

hepatocyte nuclear factor-4) or expressed at low level (e.g., SXR, steroid and xenobiotic nuclear receptor) in hTr and hCC (Table 3). In contrast, the abundance of mRNA of FXR (farnesoid or bile acid nuclear receptor) and SHP (small heterodimer partner) was similar to (in hTr and Jeg-3 cells) or higher than (in BeWo and JAr cells) in liver (Table 3). Other nuclear receptors, such as CAR (constitutive androstane receptor) and RAR α (retinoic acid receptor- α), were clearly expressed in both hTr and hCC, whereas the expression of HNF4 was not detectable (Table 3).

3.4. Functional studies in hCC

To evaluate the functionality of the transporters expressed in hCC, and to explore the possibility of using these cells as experimental models for “in vitro” study of specific aspects of the hepatobiliary-like excretory function of the placenta, E₂17 β G was chosen as a typical substrate of the import carriers and export pumps involved in liver uptake and secretion of cholephilic anions [12,16,17]. The uptake of E₂17 β G by BeWo, Jeg-3 and JAr cells (Fig. 5) and E₂17 β G efflux from

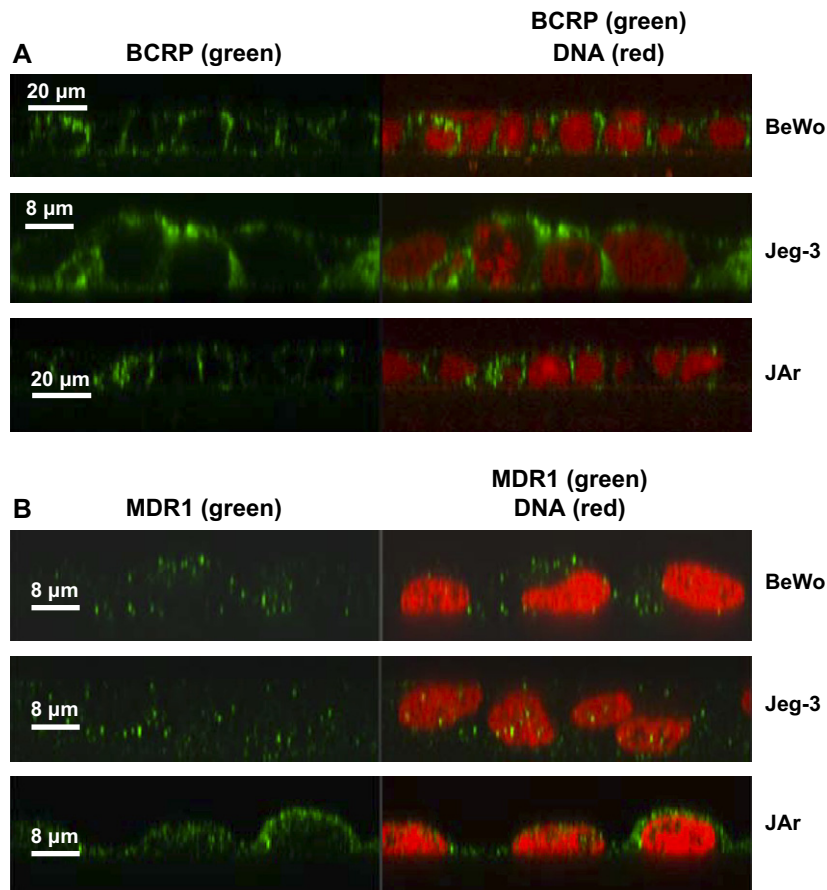


Fig. 4. Representative cross-section images of immunolocalization of BCRP (A) and MDR1 (B) in human choriocarcinoma cell lines BeWo, Jeg-3 and JAr. In right panels, nuclear DNA was stained red with propidium iodide to identify individual cells.

previously loaded cells (Fig. 6) were higher at 37 °C than at 4 °C. Moreover, the uptake of radiolabeled E₂17 β G was inhibited by the presence in the incubation medium of 20-fold higher concentrations of unlabeled E₂17 β G (Fig. 5).

4. Discussion

Functional evidence indicates that BeWo, Jeg-3 and JAr cells are able to take up organic anions via mechanisms sensitive to temperature and to self-inhibition by the substrate, suggesting that this process would be mediated by plasma membrane transporters. Here, four isoforms of the OATP family were studied as potential candidates to account for E₂17 β G uptake by hCC. These transporters are able to mediate the uptake of a large variety of substrates, including bile acids and biliary pigments [16]. The results concerning expression levels in hTr and hCC, in agreement with those previously reported in human trophoblast [18] and whole placenta [19], suggest that OATP-C/1B1, which plays an important role in organic anion uptake by the liver [16] is not involved in such a role in the trophoblast. Moreover, the expression levels of OATP-A/1A2, which plays a minor role in the liver transport of organic anions, at least under physiological circumstances [20] were even lower in hTr than in the liver. Nevertheless, enhanced expression of OATP-A/1A2 in hCC,

in particular in JAr cells, was found. Since the three cell lines studied here were derived from first trimester trophoblast, these results are in agreement with previous observations that OATP-A/1A2 expression in the placenta is higher during the first than during the third trimester of gestation [19].

For OATP-B/2B1 the opposite pattern was found. Its expression was low in hCC as compared to hTr and liver. The ability of this protein to transport some cholephilic anions is controversial. Thus, while the rat orthologue Oatp9/Oatp2b1 has been reported to transport taurocholate, among other substrates [21], no enhanced ability to take up bile acids was induced by expressing OATP-B/2B1 in *Xenopus laevis* oocytes [22].

OATP8/1B3 is able to transport bile acids [23] and conjugated [23] and unconjugated [12] bilirubin. Therefore, although its expression was lower in hTr and hCC (except in JAr) than in liver, OATP8/1B3 can be considered as a probable candidate, among the OATP isoforms studied here, to participate in the uptake of organic anions by the trophoblast.

The heteromeric organic solute transporter (OST) OSTalpha–OSTbeta has been recently described as a major sodium-independent basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia [24]. The expression of OSTalpha in placental cells suggests that this protein may also participate in a similar transport system to that described in other epithelia, facilitating diffusion of

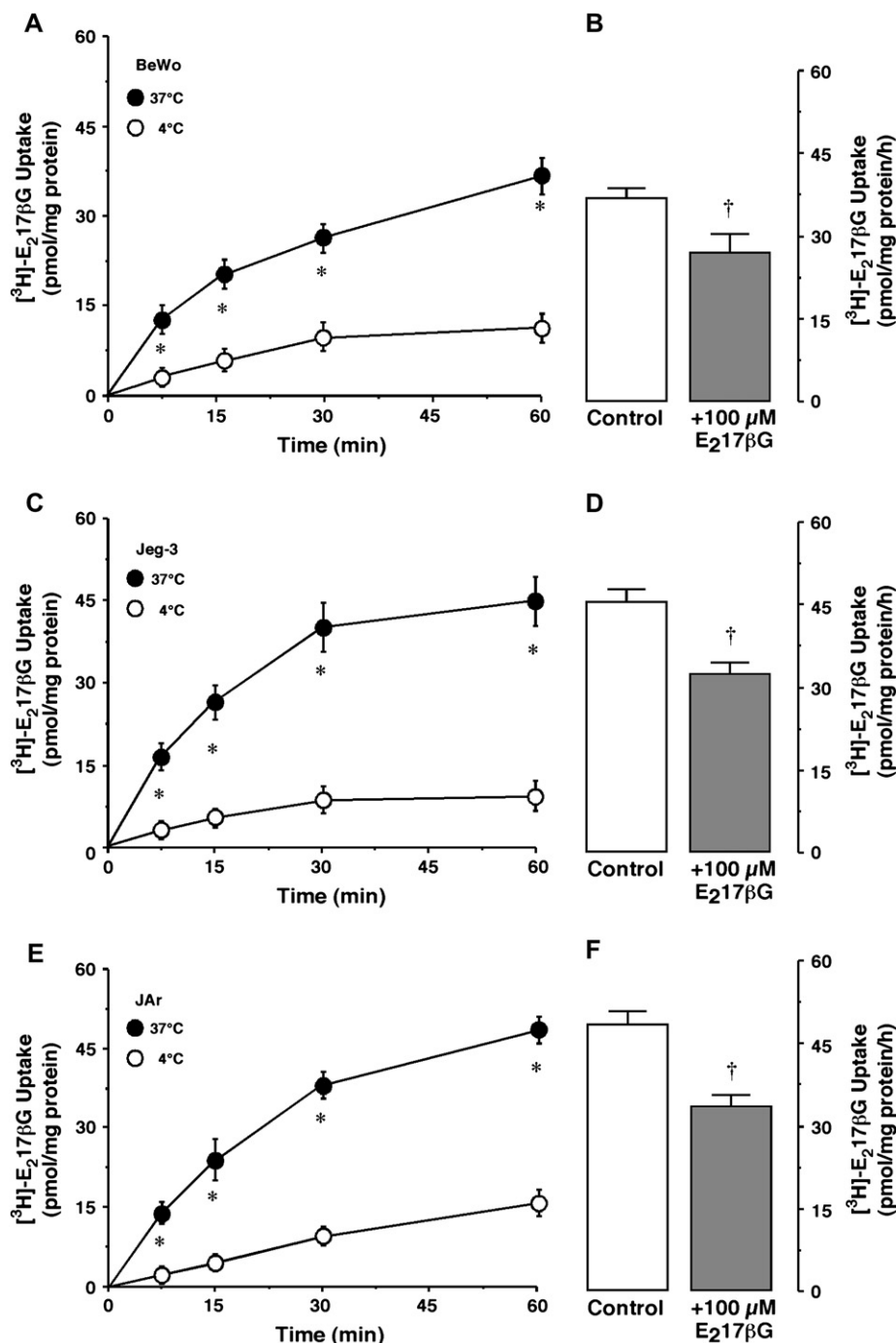


Fig. 5. Time course of the uptake of radiolabeled estradiol 17β-D-glucuronide (E₂17βG) (A, C and E) and inhibition of that uptake by unlabeled E₂17βG (B, D and F). The human choriocarcinoma cell lines BeWo (A and B), Jeg-3 (C and D) and JAr (E and F) were incubated with 5 μM radiolabeled E₂17βG with or without 100 μM unlabeled E₂17βG for 60 min at 4 °C or 37 °C. Values are means ± S.D. from results obtained in four different cultures for each cell line in which three dishes per data point were used. Significant differences were determined by the paired *t*-test. **p* < 0.05, as compared with results from similar experiments at both temperatures. †*p* < 0.05, on comparing results with and without unlabeled E₂17βG.

important steroid-related molecules across the human trophoblast.

Regarding export pumps, the expression of MRP1, MRP3 and BCRP in hTr suggests that they may play an important role in the efflux of organic anions from this tissue. When the presence of MRP1 in human placenta was first described, this was suggested to be located in the apical membrane of the

trophoblast [25]. However, more recent investigations have corrected this concept by locating MRP1 in the basal membrane of this tissue, as in other epithelial cells [26]. In any event, MRP1 could account for E₂17βG efflux from previously loaded cells, which is not the case for MRP3, as this export pump is poorly expressed in hCC. Although MRP4 [27,28] and MRP8 [29] are able to transport bile acids, and we have

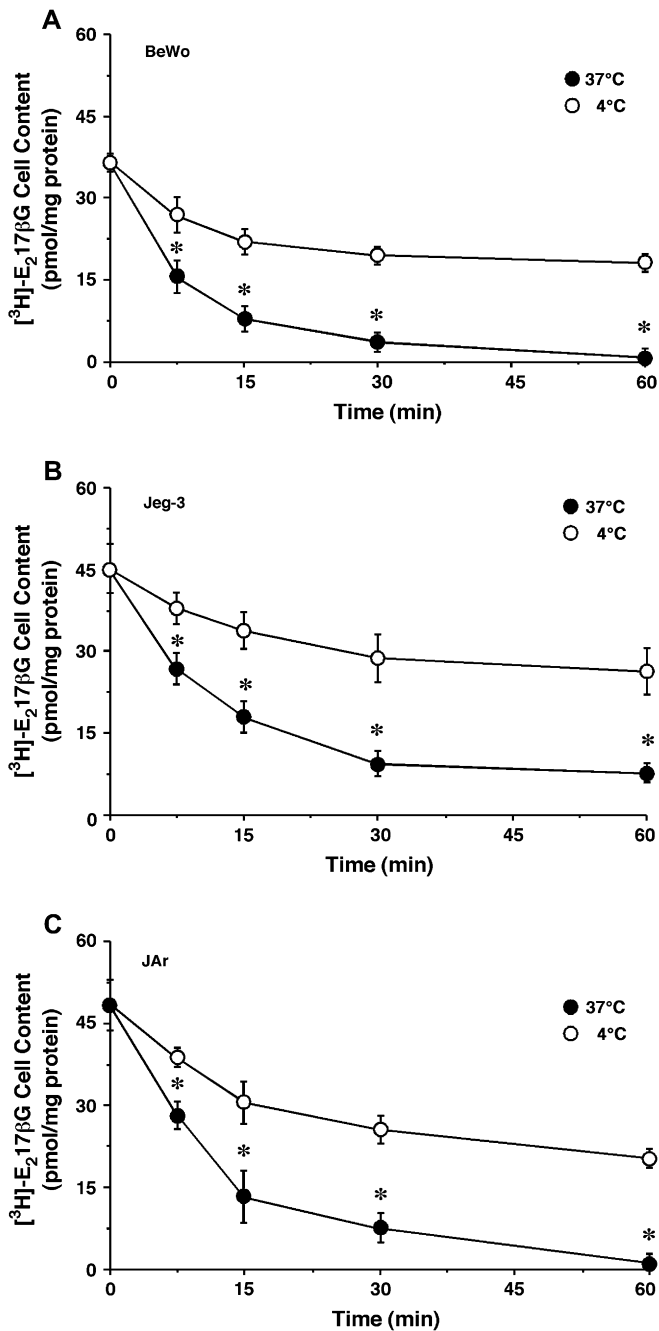


Fig. 6. Time course of estradiol 17 β -D-glucuronide (E₂17 β G) efflux from previously loaded cells. The human choriocarcinoma cell lines BeWo (A), Jeg-3 (B) and JAr (C) were incubated with 5 μ M radiolabeled E₂17 β G at 37 °C for 60 min. The cells were then transferred to E₂17 β G-free medium and incubated at 4 °C (open circles) or 37 °C (closed circles) for 60 min. Values are means \pm S.D. from results obtained in four different cultures for each cell line in which three dishes per data point were used. Significant differences were determined by the paired *t*-test. **p* < 0.05, on comparing results from similar experiments at both temperatures.

detected their expression in hTr, this was very low to suggest a major contribution to the hepatobiliary-like role of the placenta at term.

The presence of BSEP in rat and human placenta was reported some time ago [30]. Recent measurements of the

relative abundance of mRNA for this protein suggested low levels in whole first trimester placenta and an almost undetectable expression in the third trimester [19]. In the present study, using several approaches we conclude that BSEP is indeed expressed, although at very low levels, in hTr, which do not support a major role of BSEP in previously described ATP-dependent bile acid transport across the apical membrane of the human trophoblast [2].

Hepatobiliary function, even in the liver, is not limited to bile acid transport but also involves the detoxification of many different endogenous and xenobiotic compounds by phase III processes. These include the MDR1-mediated export of a large variety of substances outside of cells. The placental expression of MDR1 has been reported to be high throughout pregnancy [31,32] helping to protect the fetus from potentially noxious compounds [33]. Our results confirm the expression of MDR1 at similar levels in liver, hTr, and HCC.

MDR3 is believed to be a phosphatidylcholine flippase. Thus, MDR3, located in the canalicular membrane of hepatocytes, plays a crucial role in the secretion of phospholipids into bile. Moreover, it has been shown that MDR3 can transport a subset of MDR1 substrates. Thus, a role of this protein in the placental hepatobiliary function cannot be ruled out. However, the present study suggests that the trophoblast did not probably account for the high level of MDR3 mRNA previously reported when measurements were carried out in whole placenta [19].

FIC1 is not an ABC protein but a P-type ATPase (ATPase II) that may play a role as an aminophospholipid translocase in mammals [34]. Controversial results have been found regarding the measurement by RT-PCR of FIC1 expression in whole term placentas. This was not initially found [34], probably because the mRNA of trophoblast was diluted in the mix with that of other placental tissues and because mRNA for this protein is highly abundant in first trimester placentas but is progressively reduced afterwards [19]. In the present study FIC1 mRNA was clearly detected in both hTr and hCC. The physiological role of FIC1 among the placental transport/barrier processes is not known but it may well be a regulatory one in maintaining membrane asymmetry.

Xenobiotics-, oxysterols-, and bile acids-sensing transcription factors, such as SXR, FXR, SHP and HNF1 α , have been found to regulate the expression of some of the transporters investigated here [20,35,36]. HNF1 α , whose expression is not restricted to the liver, plays an important role in the regulation of liver enzymes involved in the metabolism of drugs, fatty acids and bile acids [36]. Moreover, it may affect the expression of carriers for organic anions, such as OATP-C/1B1 and NTCP [35]. It is interesting to note that both transporters (for review, see [2]; and present study) and HNF1 α are not expressed in human trophoblast.

SXR is the human orthologue of rodent PXR. This nuclear receptor is predominantly expressed in liver and is activated by several natural and synthetic pregnanes [35]. The expression level of SXR in hTr and hCC, although lower than in liver,

is compatible with a role of SXR as a sensor able to regulate the expression of genes involved in preventing the accumulation of potentially toxic compounds, including some bile acid species, as happens in the liver [35]. Moreover, CAR and RAR α , which are involved in the regulation of the expression of several transporters and detoxification enzymes [36,37], are also expressed in trophoblast.

The nuclear receptor FXR that forms an obligate heterodimer with RXR is highly expressed in liver, intestine, kidney, and adrenal glands [35]. Certain bile acids and their respective conjugated metabolites have been identified as endogenous ligands for FXR. The gene encoding SHP was identified as a major FXR target gene in the liver. The activation of FXR by bile acids induces the expression of SHP, leading to a down-regulation of several of the genes involved in bile acid metabolism and transport [20,35]. Our results demonstrate that FXR and SHP are highly expressed in hTr and hCC, suggesting that the FXR/SHP system may play a role in the control of the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. This is consistent with previous observations that hypercholanemia induced by bile duct ligation in pregnant rats and treatment of these animals with ursodeoxycholic acid results in an up-regulation of Oatp1/1a1, Oatp2/1a4, Oatp4/1b2, Mrp1, Mrp2 and Mrp3 in their placentas [15].

During the publication of the present manuscript a similar study has appeared, in which the expression of some of the ABC proteins investigated here has been determined in trophoblast, BeWo and JAr [38]. In general, both studies are consistent, although there are some apparent discrepancies regarding comparison of mRNA abundances among different genes. This was probably due to the fact that Evseenko et al. [38] determined relative mRNA levels, whereas in the present study the absolute amount of mRNA for each gene was measured.

In conclusion, the present study confirms that the trophoblast is equipped with carriers for organic anions and export pumps similar to those involved in the transport of cholephilic substances in the liver. Nevertheless, important differences between both organs do exist. These include the fact that NTCP, OATP-C/1B1 and BSEP, which play an important role in liver uptake and secretion of bile acids, are not relevant in placental physiology. In contrast, MRP1, MRP3 and BCRP, which, at least under physiological circumstances probably have a low contribution to the handling of cholephilic organic anions by the liver, may play an important role in the transfer of these substances from the fetus to the mother across the placenta.

Acknowledgements

Secretarial help by M.I. Hernandez, technical help by E. Flores, assistance with immunohistochemical studies by M.T. Sanchez Montero, and supervision of the English version of the submitted manuscript by N. Skinner are gratefully acknowledged.

References

- [1] Colombo C, Zuliani G, Ronchi M, Breidenstein J, Setchell KDR. Biliary bile acid composition of the human fetus in early gestation. *Pediatr Res* 1987;21:197–200.
- [2] Marin JJG, Macias RI, Serrano MA. The hepatobiliary-like excretory function of the placenta. A review. *Placenta* 2003;24:431–8.
- [3] Briz O, Macias RIR, Serrano MA, Gonzalez-Gallego J, Bayon JE, Marin JJG. Excretion of foetal bilirubin by the rat placenta—maternal liver tandem. *Placenta* 2003;24:462–72.
- [4] Marin JJG, Briz O, Serrano MA. A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs. *Curr Drug Deliv* 2004;1: 275–89.
- [5] Pasanen M, Pelkonen O. The expression and environmental regulation of P450 enzymes in human placenta. *Crit Rev Toxicol* 1994;24: 211–29.
- [6] Kitano T, Iizasa H, Hwang IW, Hirose Y, Morita T, Maeda T, et al. Conditionally immortalized syncytiotrophoblast cell lines as new tools for study of the blood–placenta barrier. *Biol Pharm Bull* 1988;27:753–9.
- [7] White TE, Saltzman RA, Di Sant'Agnes PA, Keng PC, Sutherland RM, Miller RK. Human choriocarcinoma (JAR) cells grown as multicellular spheroids. *Placenta* 1988;9:583–98.
- [8] Aplin JD, Sattar A, Mould AP. Variant choriocarcinoma (BeWo) cells that differ in adhesion and migration on fibronectin display conserved patterns of integrin expression. *J Cell Sci* 2002;103:435–44.
- [9] Kliman HN, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss III JF. Purification, characterization and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human placentae. *Endocrinology* 1986;118:1567–82.
- [10] Douglas GC, King BF. Differentiation of human trophoblast cells in vitro as revealed by immunocytochemical staining of desmoplakin and nuclei. *J Cell Sci* 1990;96:131–41.
- [11] Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, Desoye G. Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta* 2000;21:733–41.
- [12] Briz O, Serrano MA, Macias RI, Gonzalez-Gallego J, Marin JJG. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8 in the human placenta—maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J* 2003;371:897–905.
- [13] Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;87:206–10.
- [14] Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Kuhlkamp T, Keppler D, Haussinger D, et al. Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 2005;41:1160–72.
- [15] Serrano MA, Macias RI, Vallejo M, Briz O, Bravo A, Pascual MJ, et al. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta—maternal liver tandem excretory pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:515–24.
- [16] Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Arch* 2004;447:653–65.
- [17] Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003;22:7537–52.
- [18] Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol* 2003;284:E390–8.
- [19] Patel P, Weerasekera N, Hitchins M, Boyd CA, Johnston DG, Williamson C. Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta* 2003;24:39–44.
- [20] Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 2004;126:322–42.
- [21] Nishio T, Adachi H, Nakagomi R, Tokui T, Sato E, Tanemoto M, et al. Molecular identification of a rat novel organic anion transporter moat1,

- which transports prostaglandin D(2), leukotriene C(4), and taurocholate. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:831–8.
- [22] St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T. Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1856–63.
- [23] Konig J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol* 2000;278:G156–64.
- [24] Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, et al. OSTalpha–OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 2005;42:1270–9.
- [25] St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RIR, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, et al. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol* 2000;279:R1495–503.
- [26] Atkinson DE, Greenwood SL, Sibley CP, Glazier JD, Fairbairn LJ. Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol* 2003;285:C584–9.
- [27] Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 2003;38:374–84.
- [28] Zelcer N, Reid G, Wielinga P, Kuil A, van der Heijden I, Schuetz JD, et al. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J* 2003;371:361–7.
- [29] Chen ZS, Guo Y, Belinsky MG, Kotova E, Kruh GD. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* 2005;67:545–57.
- [30] St-Pierre MV, Serrano MA, Lauper U, Marin JJG, Meier PJ. Identification of bile salt transporters in human and rat placenta. *Placenta* 1999;20:A64.
- [31] Cordon-Carlo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;38:1277–87.
- [32] Mylona P, Glazier JD, Greenwood SL, Sides MK, Sibley CP. Expression of the cystic fibrosis (CF) and multidrug resistance (MDR1) genes during development and differentiation in the human placenta. *Mol Hum Reprod* 1996;2:693–8.
- [33] Nakamura Y, Ikeda S, Furukawa T, Sumizawa T, Tani A, Akiyama S, et al. Function of P-glycoprotein expressed in placenta and mole. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:849–53.
- [34] Mouro I, Halleck MS, Schlegel RA, Mattei MG, Williamson P, Zachowski A, et al. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ATPase II gene, member of the third subfamily of P-type ATPases and orthologous to the presumed bovine and murine aminophospholipid translocase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:333–9.
- [35] Akiyama TE, Gonzalez FJ. Regulation of P450 genes by liver-enriched transcription factors and nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta* 1619:2003:223–34.
- [36] Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001;294:1866–70.
- [37] Karpen SJ. Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol* 2002;36:832–50.
- [38] Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA. ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. *Am J Physiol* 2006;290:R1357–65.